



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**PROBLEMATIKA PRODUKCE ŘAS RODU CHLORELLA V
PRŮTOČNÝCH BIOREAKTORECH**

ISSUES OF THE ALGAE CHLORELLA PRODUCTION IN FLOW BIOREACTORS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Kristína Jankovičová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. Ing. Tomáš Svěrák, CSc.

BRNO 2019

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1203/2017
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Kristína Jankovičová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie
Vedoucí práce: **prof. Ing. Tomáš Svěrák, CSc.**
Akademický rok: 2018/19

Název diplomové práce:

Problematika produkce řas rodu *Chlorella* v průtočných bioreaktorech

Zadání diplomové práce:

Literární rešerše kultivačních podmínek a užitných vlastností řas rodu *Chlorella*,
laboratorní kultivace vybraného typu řas,
vyhodnocení testů a porovnání s literárními údaji

Termín odevzdání diplomové práce: 10.5.2019

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Kristína Jankovičová
student(ka)

prof. Ing. Tomáš Svěrák, CSc.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Mikroriasy vzbudzujú pozornosť vedcov vďaka ich jedinečným vlastnostiam, medzi ktoré patrí ich schopnosť rýchleho rastu, akumulácie lipidov a iných významných látok, schopnosť viazať oxid uhličitý a čistiť odpadné vody. Táto diplomová práca sa zaoberá práve problematikou mikrorias a snaží sa opísať a pochopiť proces kultivácie za účelom jej optimalizácie. Teoretická časť diplomovej práce pojednáva o charakteristikách mikrorias, hlavne komerčne úspešnej riasy *Chlorella sp.*, jej využití a optimalizácii procesu kultivácie za účelom zisku čo najvyššej biomasy. Praktická časť je rozdelená na tri dielčie úlohy. Prvá sa venuje porovnaniu heterotrofnej a autotrofnej kultivácie rôznych kmeňov riasy *Chlorella* a riasy *Coccomyxa* v troch rôznych kultivačných médiách: v synteticky pripravenom chlorellovom médiu a rôzne zriedenom prírodnom prípravku Florium (50 a 20násobné zriedenie). Najvyššia koncentrácia biomasy, 7,10 g/l, bola dosiahnutá heterotrofnou kultiváciou, pri použití syntetického média. V druhej úlohe bol sledovaný rast riasy *Coccomyxa* a *Chlorella*, kmeň C1A, v závislosti od teploty a intenzity svetla. Pokus bol vykonaný v rôznych kombináciách týchto dvoch významných rastových faktorov. *Chlorella* dosiahla maximum pri teplote 33,5 °C a intenzite svetla 320 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, a to 11,46 g/l. Ďalej bol sledovaný rast riasy *Dictiosphaerium chlerelloides* na plošinovom kaskádovom bioreaktore. Experiment viedol k zisteniu, že riasa je schopná rastu aj pri teplotách okolo 10 °C, kedy by komerčne známejšie riasy ako *Chlorella sp.* či *Arthrospina sp.*, prakticky nerástli.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

mikroriasy, chlorella, kultivácia, rastové faktory, optimalizácia

ABSTRACT

Microalgae invite the attention of scientists due to their unique properties, including their quick growth, accumulation of lipids and other valuable substances, fixation of carbon dioxide and treatment of wastewater. This master's thesis is focused on the study of microalgae. The main goal is to understand and describe the process of microalgae cultivation, in order to optimize it. The theoretical part of this thesis deals with microalgae (mainly *Chlorella* sp.) characterization, its practical use and cultivation optimization in order to obtain the highest concentration of biomass. The experimental part is divided into three tasks. Aim of the first task was the comparison of the course of autotrophic and heterotrophic cultivation of various strains of *Chlorella* and *Coccomyxa* microalgae, using three different cultivation media – synthetic medium for chlorella cultivation and natural fertilizer, Florium, used in two different concentrations (diluted 50 and 20 times). The highest *Chlorella* sp. biomass concentration of 7,10 g/l was achieved in the synthetic heterotrophic medium. Second task was focused on monitoring of the growth of algae *Coccomyxa* and *Chlorella* strain C1A, with respect to temperature and light intensity, using various combinations of these two important growth factors. *Chlorella* achieved its highest concentration of 11,46 g/l when grown at temperature of 33,5 °C and light intensity of 320 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. The third and final task was to observe the growth of *Dictiosphaerium chlerelloides* microalgae on a flat cascade bioreactor. The experiment led to the discovery that these algae were able to grow at temperatures of around 10 °C, at which many well-known commercial algae, such as *Chlorella* sp. or *Arthrospina* sp., simply wouldn't grow.

KEY WORDS

microalgae, Chlorella, cultivation, growth factors, optimization

JANKOVIČOVÁ, Kristína. *Problematika produkce řas rodu Chlorella v průtočných bioreaktorech*. Brno, 2019. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/106001>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Tomáš Svěrák.

PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som diplomovú prácu vypracovala samostatne, a že všetky použité literárne zdroje sú správne a úplne citované. Diplomová práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť využitá ku komerčným účelom len so súhlasom vedúceho diplomovej práce a dekana FCH VUT.

.....

Podpis študenta

POĎAKOVANIE

Rada by som poďakovala prof. Ing. Tomášovi Svěrákovi, CSc. a vedeniu firmy Ecofuel Laboratories za pomoc a rady pri realizácii experimentálnej časti diplomovej práce.

OBSAH

1. ÚVOD	8
2. TEORETICKÁ ČASŤ.....	9
2.1. Mikroriasy	9
2.1.1. Charakteristika chlorelly	9
2.1.2. Využitie riasy chlorella.....	9
2.2. Kultivácia	11
2.2.1. Vsádková kultivácia	11
2.2.2. Fed-batch kultivácia	12
2.2.3. Kontinuálna kultivácia.....	13
2.2.4. Autotrofná kultivácia	13
2.2.5. Heterotrofná kultivácia	13
2.2.6. Mixotrofná kultivácia	14
2.2.7. Kultivácia v otvorenom systéme	14
2.2.8. Fotobioreaktory	16
2.3. Scale up proces	18
2.4. Optimalizácia podmienok rastu a produkcie mikrorias	19
2.4.1. Svetlo	20
2.4.2. Teplota	21
2.4.3. pH	21
2.4.4. Živné médium.....	21
2.4.5. CO ₂ ako zdroj uhlíka	22
3. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	24
3.1. Použité chemikálie, prístroje a mikroorganizmy	24
3.1.1. Použité chemikálie.....	24
3.1.2. Použité laboratórne zariadenie.....	24
3.1.3. Použité mikroorganizmy.....	26
3.2. Kultivačné média	29
3.2.1. Heterotrofné chlorellové médium.....	29
3.2.2. Florium	30
3.2.3. Porovnanie zloženia použitých kultivačných médií	30

3.3.	Použité metódy.....	31
3.3.1.	Heterotrofná kultivácia	31
3.3.2.	Autotrofná kultivácia	31
3.3.3.	Kultivácia na skríženom gradiente	32
3.3.4.	Kultivácia na kaskádovej plošine	33
3.3.5.	Stanovenie biomasy	34
4.	VÝSLEDKY A DISKUSIA.....	35
4.1.	Heterotrofná kultivácia	35
4.2.	Autotrofná kultivácia	39
4.3.	Porovnanie heterotrofnej a autotrofnej kultivácie.....	43
4.4.	Kultivácia na skríženom gradiente.....	45
4.4.1.	Kultivácia kmeňa Coccomyxa.....	45
4.4.2.	Kultivácia kmeňa C1A	47
4.5.	Kultivácia na kaskádovej plošine.....	49
5.	ZÁVER.....	52
6.	ZOZNAM POUŽITÝCH ZDROJOV	54
7.	PRÍLOHY	59

1. ÚVOD

Mikroriasy sú heterogénnou skupinou jednobunkových alebo jednoduchých mnohobunkových fotosyntetizujúcich organizmov. Niektoré druhy sú zaujímavé z pohľadu potenciálnych aplikácií ako zdroje bielkovín a lipidov alebo iných vysoko hodnotných zlúčenín, napríklad omega-3-mastných kyselín, karotenoidov alebo vitamínov. Okrem toho môžu byť pestované bez použitia ornej pôdy, a preto poskytujú príležitosť k produkcii potravy na v súčasnej dobe neobrábanej alebo neobrábateľnej pôde bez ďalšej hospodárskej súťaže s produkciou plodín [51].

Rast mikrorias a spôsob akumulácie živín je do značnej miery závislý na kultivačnom procese, zahrnujúc faktory prostredia (teplota, svetlo a iné) a zásobu živín (uhlík, dusík, fosfor). Tieto premenné majú veľký efekt na chemické zloženie a produktivitu a reakcie kultúry môžu byť špecifické pre rôzne druhy alebo kmene mikroorganizmov. V dôsledku toho sa môže zloženie živín mikrorias v rámci rôznych druhov významne líšiť, čo môže byť škodlivé ak sú riasy určené pre použitie v priemyselnej výrobe potravín a krmív, kde je nutné dosahovať štandardných hodnôt zloženia suroviny. Na druhú stranu ale poskytuje táto vlastnosť rias príležitosť meniť ich zloženie na požadovanú štruktúru a teda produkovať biomasu prispôbenú špecifickým požiadavkám potravinárskeho a krmného priemyslu [51].

Mikroriasy predstavujú vo všeobecnosti obnoviteľný a ekologicky nezávadný zdroj pre produkciu rôznych bio-produktov. Špecifickou výhodou mikrorias je, že prispievajú k redukcii uhlíka počas rozmnožovania a rastu. Na jednu libru (0,45 kg) vypestovanej biomasy sa totiž spotrebuje 0,82 kg CO₂ z atmosféry. Snahou dneška je znížiť náklady na kultiváciu rias. Proces pestovania, zberu a spracovania je totiž energeticky aj cenovo veľmi náročná. Zvlášť pre produkciu biopalív sú súčasné kultivačné a procesné metódy ekonomicky neúnosné. Na základe týchto poznatkov vznikli rady štúdií zaoberajúce sa optimalizáciou podmienok kultivácie rias. Optimalizácia niektorých faktorov kultivácie, ako napríklad živín, či svetla, by mohla významne znížiť produkčné náklady a zlepšiť tak ekonomické nároky následného spracovania produktu [29].

2. TEORETICKÁ ČASŤ

2.1. Mikroriasy

Riasy tvoria časť rozsiahlej skupiny fotosyntetizujúcich mikroorganizmov a sú špecifické vysokou rýchlosťou rastu. Vďaka schopnosti prežiť v širokom spektre podmienok, riasy patria medzi najrozšírenejšie organizmy na Zemi. Sú rozšírené v celej biosfére. Zvyčajne sa nachádzajú vo vode (od sladkých až po extrémne slané vody). Od iných mikroorganizmov sa líšia tým, že sú schopné vykonávať fotosyntézu v každej jednotlivéj bunke. Bunka rias je tvorená oddeleným jadrom, pyrenoidom, bunkovou stenou, chloroplastami obsahujúcimi chlorofyl a ďalšie farbivá. V niektorých prípadoch bunka obsahuje bičík a svetločervenú škvrnu (stigma). Mikroriasy sú riasy mikroskopických rozmerov. Ako fotosyntetizujúce organizmy zohrávajú veľkú rolu pri vytváraní atmosférických podmienok na Zemi. Bolo dokázané, že produkujú až polovicu kyslíka, ktorý dýchame [1-3].

2.1.1. Charakteristika chlorelly

Chlorella je rod sladkovodných jednobunkových mikrorias triedy Chlorophyceae. Sú radené do oddelenia Chlorophyta, teda zelených rias, charakteristického pre riasy obsahujúce chlorofyl *a* a *b*, mitochondrie s lamelárnymi kristami. Škrob ukladajú do chloroplastov. Do tejto triedy patrí ďalších 9 – 12tisíc iných druhov [4].

Riasy rodu *Chlorella* majú guľovitý tvar o priemere 2 – 10 µm. Nemajú bičík a rozmnožujú sa nepohlavne prostredníctvom nepohyblivých buniek – autospór [5].



Obrázok 1: *Chlorella* 255, 600násobné zväčšenie

2.1.2. Využitie riasy chlorella

Chlorella bola predmetom mnohých štúdií fotosyntézy a experimentov zaoberajúcich sa kultiváciou biomasy, schopnosťou riasy čistiť odpadné vody a produkciou mnohých prospešných látok [5].

2.1.2.1. Potravinárstvo, farmácia a kozmetický priemysel

Pretože sa táto riasa rozmnožuje rýchlo a je bohatá na proteíny a vitamíny typu B, existujú mnohé štúdie skúmajúce niektoré druhy ako potenciálnu potravinu pre človeka na Zemi, ale aj vo vesmíre [5].

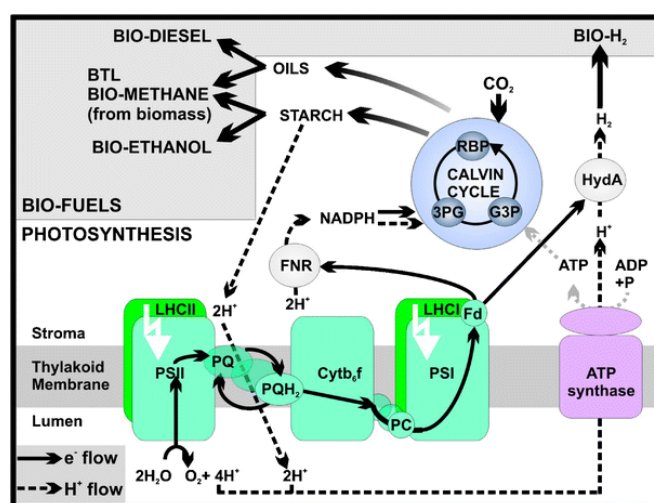
V súčasnosti je chlorella hojne využívaná ako potravinársky doplnok v strave, práve kvôli vysokému obsahu mnohých prospešných látok. Je veľmi bohatá na esenciálne i neesenciálne aminokyseliny. Vďaka obsiahnutiu všetkých vitamínov B komplexu sa chlorella niekedy využíva ako doplnok vo vegánskej strave. Samozrejme obsah látok sa môže líšiť v závislosti na kmeni, type kultivácie a použitých separačných postupov. V sušine môže obsahovať od 7-88% proteínov, 7-75% tukov, 6-38% cukrov a okolo 5% vlákniny a 10% minerálov a vitamínov [5-7].

Niektoré druhy rodu *Chlorella* (hlavne *Chlorella vulgaris*) boli použité k získaniu chlorofylu, ktorý sa používa ako pigment. Okrem toho sa mu pripísali aj antikarcinogénne vlastnosti. Avšak asi najdôležitejšou látkou v chlorelle je β -1,3-glukan, ktorý pôsobí ako aktívny imunostimulátor, pretože zachytáva voľné radikály. *Chlorella pyrenoidosa* a *Chlorella ellipsoidea* obsahujú komplexné polysacharidy, ktoré majú taktiež imunostimulačné vlastnosti. Ďalšia štúdia chlorelly preukázala jej antioxidačné, protizápalové a analgetické schopnosti [8].

V rámci kozmetického priemyslu sú riasy rodu chlorella využívané vďaka obsahu polysacharidov vhodných na použitie ako gélové činidlá a zahusťovadlá v rôznych kozmetických formulách, ale aj ako hydratujúca zložka. V rámci prípravkom proti starnutiu pokožky bolo zistené, že výťažok z *Chlorella vulgaris* podporuje mechanizmy pre obnovu kolagénu, čím napomáha k obnove pružnosti kože [8].

2.1.2.2. Produkcia biopaliva

Biopalivá sú ekologicky nezávadné alternatívy ku konvenčným palivám, vyrábané z obnoviteľných zdrojov ako rastlinné oleje a živočíšny tuk [9].



Obrázok 2: Fotosyntéza ako kľúčový proces produkcie biopaliva z rastlinných zdrojov [10]

Existuje mnoho štúdií poukazujúcich na výhody použitia mikrorias na účel produkcie biopalív oproti iným používaným surovinám: ich kultivácia je jednoduchá, nepotrebuje takmer žiadnu starostlivosť človeka, dokážu rásť vo vode nevhodnej na ľudskú konzumáciu a nie sú náročné na živiny. Vzhľadom na ich druhovú rozmanitosť, je možné použiť druh, ktorý sa hodí do konkrétnych podmienok, čo sa nedá povedať o aktuálnych zdrojoch (sója, slnečnica, repka a palmový olej). Majú výrazne vyššiu produktivitu a rýchlejšiu rast ako konvenčné lesníctvo, poľnohospodárske plodiny a iné vodné rastliny a vyžadujú omnoho menšie plochy, a to až 49 – 132krát menej ako u repky alebo sóje (pri 30% obsahu oleja v biomase). Tým pádom by sa znížila konkurencia na ornej pôde s inými plodinami, hlavne pre ľudskú spotrebu [2].

Hoci palivo získané takýmto spôsobom neobsahuje žiadnu síru ani jej deriváty môže byť na druhej strane dôsledkom zvýšených emisií NO_x v niektorých typoch motorov [2].

V reálnych priemyselných podmienkach je však produkcia biopalív riasami zatiaľ nepravdepodobná, pretože vysoké investičné a prevádzkové náklady na produkciu rasových biopalív až rádovo presahujú cenu palív fosílnych. Stratégiou zlacnenia produkčných nákladov je možnosť využitia geneticky modifikovaných produkčných kmeňov, či extrakcia olejov priamo z mokrej riasovej biomasy [46].

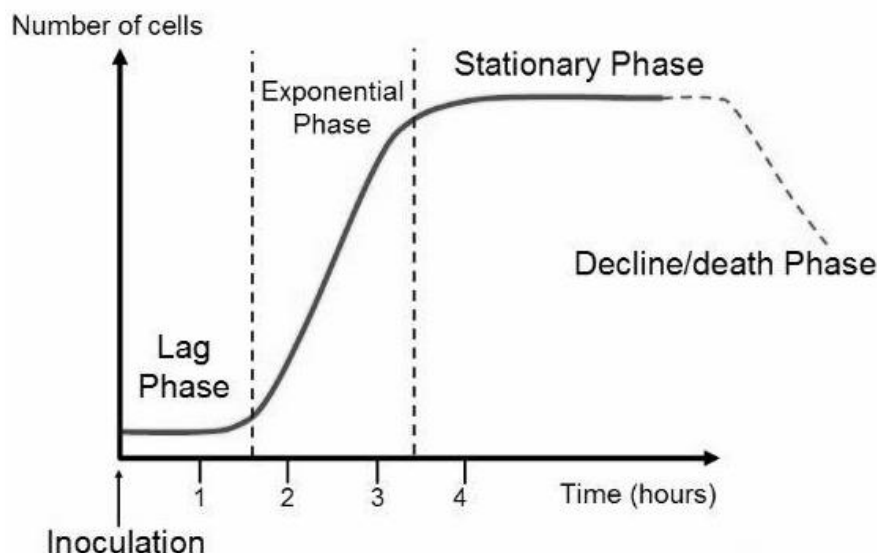
2.2. Kultivácia

Kultivácia je umelý spôsob rozmnožovania organizmov. Rozmnožovanie prebieha v dopredu určenom kultivačnom médiu. Existuje viacero rozdelení kultivácie. Medzi to základné patrí rozdelenie podľa prísunu živín vo forme média do kultúry, v rámci ktorého rozlišujeme tri typy kultivácie: vsádková, fed-batch a kontinuálna kultivácia. Ďalším dôležitým rozdelením je rozlíšenie zdroju uhlíka v médiu. To môže byť kultivácia autotrofná, kedy organizmus využíva ako zdroj energie anorganický uhlík, alebo kultivácia heterotrofná, v ktorej organizmus spotrebúva organický uhlík, napríklad vo forme glukózy. Mixotrofná kultivácia predstavuje kombináciu autotrofných a heterotrofných podmienok. Možno ju rozčleniť aj podľa zariadenia, resp. prostredia, v ktorom prebieha – na kultiváciu v uzavretom systéme (bioreaktor) alebo v otvorených systémoch, napríklad nádržkách [11].

2.2.1. Vsádková kultivácia

Vsádková kultivácia je charakteristická tým, že je bezzásahová. To znamená, že sa do nej behom kultivácie nepridávajú žiadne látky, ako napríklad čerstvé médium, a nedochádza ani k odberom (produkty, biomasa). Vďaka svojej nenáročnosti je často využívaná na rôzne štúdie. Vsádková kultivácia má výhodu v tom, že je jednoduchá na realizáciu a ako reaktor sa dá využiť napríklad aj Erlenova banka, čo umožňuje vykonávať viac experimentov paralelne. Nevýhodou tejto metódy je, že experimentálne dáta sú zložitejšie na interpretáciu, pretože podmienky v reaktore sa s časom menia, a teda sa mení aj ich vplyv na bunku. Tieto zmeny možno eliminovať použitím zložitejších bioreaktorov, ktoré sú schopné udržať niektoré premenné, ako je pH a obsah rozpusteného kyslíka, konštantné [12,13].

U tohto typu kultivácie možno pozorovať špecifický rast buniek, ktorý sa graficky znázorňuje tzv. rastovou krivkou, vid' Obrázok 3. Tá pozostáva zo štyroch hlavných fáz: lag fázy, exponenciálnej fázy, stacionárnej fázy a fázy odumierania buniek.



Obrázok 3: Rastová krivka [14]

Lag fáza charakterizuje adaptačné obdobie, kedy sa mikroorganizmus prispôbuje novému prostrediu a podmienkam. Jej dĺžka sa môže značne líšiť, a to na základe toho, ako veľmi sú odlišné podmienky k tým, z ktorých mikroorganizmus pochádza. V priemysle je žiadúce aby táto fáza dosahovala čo najkratší čas a preto sú často aktívne bunky prevádzané do rovnakého, alebo veľmi podobného média a podmienok [15].

Exponenciálna fáza, alebo log fáza, sa vyznačuje exponenciálnou závislosťou koncentrácie buniek na čase. Organizmus je plne prispôbený podmienkam, čo vedie k rýchlemu nárastu biomasy. Bunky v tejto fáze sú najzdravšie a najviac jednotné, čo vysvetľuje, prečo sa v mnohých experimentoch využívajú bunky z tejto fáze. Cieľom väčšiny kultivácii je dosiahnuť čo najstrmejšiu krivku, ktorá pretrvá čo najdlhší čas [15].

V určitom okamihu sa vyčerpajú živiny potrebné pre rast a množenie buniek. Bunky začnú byť potláčané vlastným odpadom alebo nedostatkom fyzického priestoru, čo spôsobí vstup buniek do stacionárnej fáze. V tomto okamihu sa počet nových vyprodukovaných buniek rovná počtu odumretých buniek. Táto fáza je významná v mnohých odvetviach, nakoľko v nej dochádza k produkcii sekundárnych metabolitov, ako sú napríklad antibiotiká [15].

V poslednej fáze rastovej krivky počet živých buniek klesá. Stav kultúry sa zhoršuje až do bodu, kedy sú všetky bunky nenávratne poškodené až do takej miery, že ani pri prevedení do čerstvého média nevykazujú známky rastu [15].

2.2.2. Fed-batch kultivácia

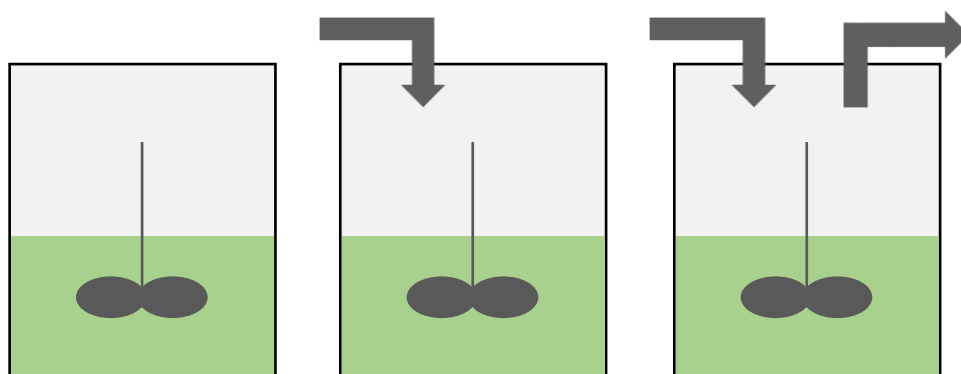
Fed-batch kultivácia je charakterizovaná vopred danou alebo kontrolovanou adíciou živín do média počas priebehu kultivácie, bez toho aby dochádzalo k odberom kultúry. Toto prevedenie umožňuje použitie viacerých variant v rámci živín, čo vedie k lepšej a presnejšej kontrole procesov ako napríklad rast bunky, príjem živín a produkciu želaných metabolitov. Kontrolované prídavky nutrientov sú často využívané na podporu produkcie sekundárnych metabolitov [12].

2.2.3. Kontinuálna kultivácia

V kontinuálnej kultivácii sú všetky živiny potrebné pre rast mikroorganizmov nepretržite privádzané do média za súčasného kontinuálneho odoberania média s kultúrou. Objem kultúry je zvyčajne kontrolovaný hladinomerom. Kontinuálnej kultivácii zvyčajne predchádza vsádková alebo fed-batch kultivácia. Stav kultúry sa určuje z vytekajúcej kultúry, čím je zabránené priamemu kontaktu s kultúrou vnútri reaktoru a predchádza sa tak možnej kontaminácii, čo nemožno povedať o predchádzajúcich dvoch typoch kultivácie [12].

V prípade, že sú kultivačné podmienky pre rast biomasy výrazne odlišné od tých pre produkciu konkrétnych metabolitov, využíva sa takzvaná dvojfázová kontinuálna kultivácia. V prvom kroku sú podmienky nastavené na podporu rastu biomasy a v druhom na produkciu žiadaných metabolitov. Aj to je ďalšou výhodou oproti vsádkovej a fed-batch kultivácii [12].

Kontinuálna kultivácia má však aj radu prevádzkových ťažkostí, zahŕňajúc riziko kontaminácie a stratu produkcie v dôsledku vyplavenia kultúry, ktorá hrozí v prípade nastvenia vyššej zried'ovacej rýchlosti. Oproti vyššie zmieneným metódam je taktiež výrazne časovo náročnejšia na započatie prevádzky [12].



Obrázok 4: Schéma princípu jednotlivých kultivácií, zľava: vsádková kultivácia, fed-batch kultivácia a kontinuálna kultivácia

2.2.4. Autotrofná kultivácia

Autotrofná kultivácia, nazývaná aj fotoautotrofná, je dnes asi najčastejšou metódou pestovania rias. Je to dané tým, že mikroriasy sú fotosyntetizujúce organizmy. Bunky rias zachytávajú slnečnú energiu a ako zdroj uhlíka využívajú CO_2 . Najväčšou limitáciou tohto spôsobu kultivácie je svetlo, na ktorom závisí rast a zvyšovanie hustoty buniek. Platí, že čím viac svetla na kultúru pôsobí, v rámci určitého intervalu, po ktorého prekročení začne mať svetlo inhibičné účinky, tým rýchlejšie rastie [16].

2.2.5. Heterotrofná kultivácia

Možnou alternatívou k autotrofnej kultivácii, avšak použiteľná len pre určité percento druhov mikrorias, je využitie ich schopnosti heterotrofného rastu pri absencii svetla, kedy sa viazanie atmosférického CO_2 nahrádza zdrojom organického uhlíka rozpusteného v kultivačnom médiu. Heterotrofia je definovaná ako využitie organických zložiek na rast organizmu. Heterotrofné organizmy sú také, ktoré čerpajú energiu a potrebné substráty z organických látok vytvorených

inými organizmami. Zloženie kultivačného heterotrofného média je podobný tomu autotrofnému, s výnimkou prídavku organického uhlíka, napríklad v podobe glukózy. Kultivácia Chlorelly v heterotrofnom médiu bola prvýkrát použitá v 90. rokoch minulého storočia využíva sa doteraz [16-18].

Produkcia mikrorias v heterotrofných podmienkach je veľmi úspešná v komerčnej sfére, kde je potrebná masová produkcia biomasy aj vedľajších produktov. Ekonomická výhodnosť bola predstavená pred 19 rokmi viacerými vedcami a je stále aktuálna. Vedci zistili, že pri heterotrofnej kultivácii mikrorias v kompletnej tme je možno dosiahnuť vysokú rastovú rýchlosť, a zberné koncentrácie až cez 100 g/l. V porovnaní s fotoautotrofnou kultiváciou bol dosiahnutý u riasy *C. protothecoides* 3,4násobok, u *C. vulgaris* 4,8násobok a u *C. sorokiniana* 3,3násobok koncentrácie biomasy [17].

Vďaka tomu, že pre heterotrofný rast rastlín nie je potrebný zdroj svetla, je možné kultivovať riasy v podstate v hocíjakom bioreaktore. To predstavuje veľkú výhodu oproti autotrofnej kultivácii. Vďaka vysokej výťažnosti heterotrofnej kultivácie sa táto metóda stala finančne menej náročnou v porovnaní s autotrofnou kultiváciou. Pre predstavu, v roku 1996 v Japonsku, ktoré je popredným producentom chlorelly, až 50% vyprodukovanej biomasy, teda cca. 500 ton, pochádzalo práve z heterotrofnej kultivácie. Ďalšími výhodami sú: vyšší obsah lipidov v biomase, odstraňovanie organického uhlíka z odpadných vôd spolu so zlúčeninami dusíku a fosforu a taktiež možnosť zmeny zdroja uhlíku v médiu a tým vplývať na produkciu metabolitov [16,17].

Heterotrofná kultivácia má však aj radu nevýhod. Existuje len určitý limitovaný počet druhov rias, schopných heterotrofného rastu, riziko kontaminácie v heterotrofnom prostredí je pomerne vysoké a vzniká neschopnosť produkovať svetlom indukované metabolity. S heterotrofnou kultiváciou tiež odpadá možnosť redukcie CO₂ v atmosfére [16].

Existuje rad výskumov zaoberajúcich sa porovnávaním rýchlosti rastu rias v heterotrofných a autotrofných podmienkach. Ukazuje sa, že druhy rodu *Chlorella*, *Tetraselmis* a *Nitzschia* rastú rýchlejšie práve v heterotrofných podmienkach [16].

2.2.6. Mixotrofná kultivácia

Mixotrofia je spôsob kultivácie, pri ktorom je použitá heterotrofia a autotrofia súčasne, čo vedie k spracovaniu anorganického a organického uhlíka za prítomnosti svetla [19].

V porovnaní s heterotrofnou a autotrofnou kultiváciou má radu výhod: vyššie rýchlosti rastu vďaka možnosti skrátiť rastový cyklus, čím sa zvýši produkcia biomasy; predĺženie exponenciálnej fázy; redukcia straty biomasy dýchaním počas vytavenia tme; redukcia alebo zastavenie vplyvu fotoinhibičného efektu; možnosť flexibilne striedať heterotrofnú a autotrofnú kultiváciu podľa potreby [17].

Tento typ kultivácie však nie je vo veľkých prevádzkach až tak rozšírený kvôli technickej náročnosti procesu [18].

2.2.7. Kultivácia v otvorenom systéme

V otvorených systémoch – čo sú prírodné či umelé nádrže, obežné náhony alebo kaskády naklonených plôch – majú kultúry mikrorias priamy kontakt s okolitým prostredím. Tieto

systémy sú konštrukčne jednoduchšie a prevádzkovo lacnejšie než fotobioreaktory a slúžia k produkcii veľkého množstva biomasy. Podľa miestnych požiadaviek a klimatických podmienok sa používajú rôzne varianty týchto zariadení vyrobených z rôznych inertných materiálov (betón, PVC, nerezová oceľ, laminát). Hĺbka suspenzie by nemala byť veľká (>10 cm), inak môže dôjsť k nízkemu ožiareniu buniek a nedostatočnému premiešavaniu, ktoré je zabezpečené rôznymi miešadlami (lopatkové, rotujúce, čerpadlá, prebublávanie a iné). Kultúry sú väčšinou pestované pri nižších koncentráciách ($0,5-1$ g/l) s nízkou produktivitou (asi $1 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{deň}^{-1}$). Výhodou, okrem lacnej prevádzky, je, že sa takmer neprehrievajú, umožňujú jednoduchý odvod vznikajúceho kyslíku a ich obsluha je relatívne jednoduchá. Otvorené systémy sú vhodné pre rýchle rastúce kmene alebo také, ktoré sa kultivujú za veľmi špecifických podmienok. Pre veľkoobjemové produkcie biomasy sa obvykle využívajú mikroriasy *Arthrospira*, *Chlorella*, *Dunaliella* a *Nannochloropsis*. Otvorené nádrže sa používajú pre pestovanie *Spiruliny* a *Chlorelly* v Japonsku, Thajsku, Kalifornii, na Havaji, Taiwane, v Indii a Číne [20].

Iným variantom sú tenkovrstvové systémy s vrstvou kultúry o hrúbke niekoľko milimetrov až centimetrov, čím je zabezpečené dobré osvetlenie buniek v celom objeme suspenzie. Turbulencia je zaistená cirkuláciou kultúry pomocou čerpadla. Konkrétnym príkladom sú tzv. kaskády „třeboňského typu“, ktoré sa používajú už od 60. rokov minulého storočia pre kultiváciu rýchlo rastúcich kmeňov zelených rias (*Chlophyta*). Kultúra mikrorias rastie vo vrstve tenšej ako jeden centimeter, takže pomer ožiareného objemu je vysoký a vďaka tomu je možné dosiahnuť vysokú hustotu biomasy – $15-35$ g/l. Reálna rastová rýchlosť sa môže pohybovať okolo 20 gramov sušiny na meter štvorcový za deň v miernom klimatickom pásme. [20].



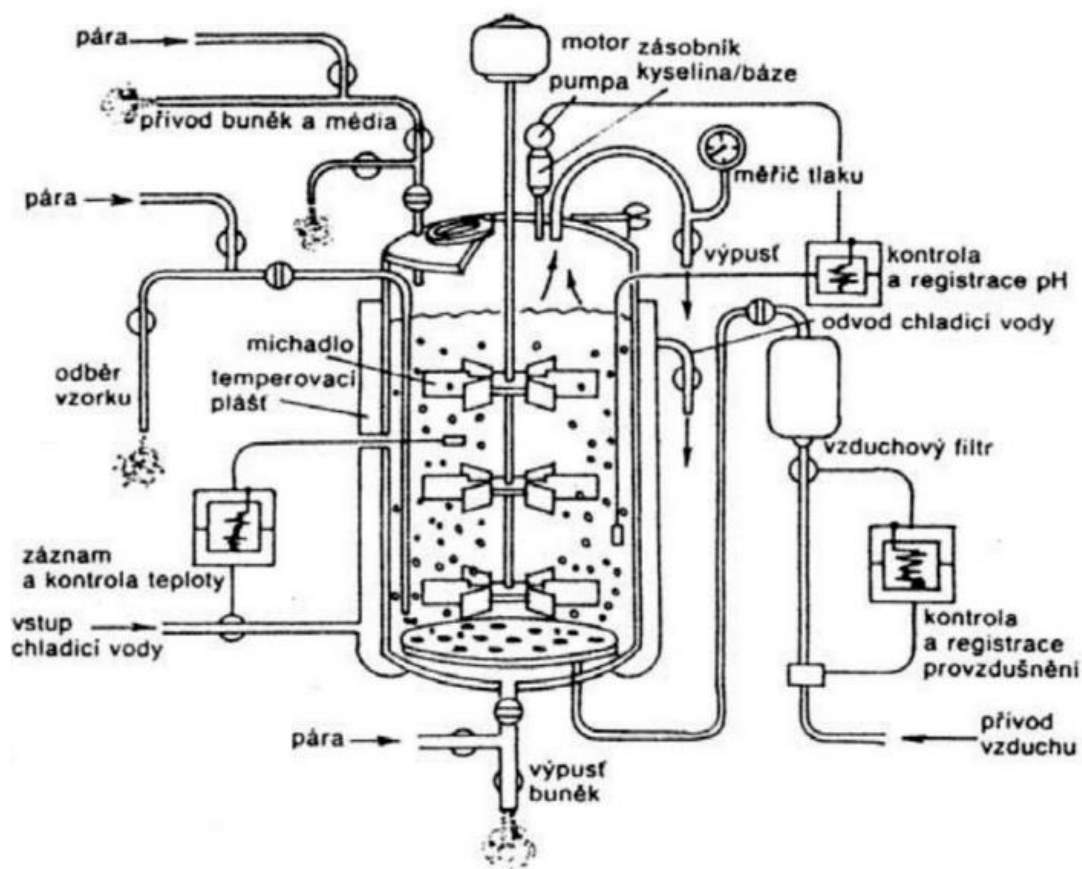
Obrázok 5: Kaskádový tenkovrstvový kultivačný systém v Třeboni [45]

Medzi najväčšiu nevýhodu takéhoto spôsobu kultivácie patrí vyššie riziko kontaminácie inými mikroorganizmami. Kontaminácii inými mikroriasami je však možné predchádzať nasadením rias, ktorý rastie rýchlo, čím je schopná potláčať rast iných, neželaných rias. Ďalším mínusom je cena zberu biomasy, ktorá je v dôsledku nižších koncentrácií biomasy a spracovávaní vyšších objemov vody, vyššia v porovnaní s uzavretými fotobioreaktormi [20, 21].

2.2.8. Fotobioreaktory

Bioreaktory, alebo fotobioreaktory, vznikli ako alternatíva ku kultiváciám v otvorených nádržach. Ich používanie sa datuje k neskorým štyridsiatym rokom 20. storočia, kedy vznikli ako výsledok skúmania princípov fotosyntézy v riasach rodu *Chlorella*. Môžu byť umiestnené v exteriéri alebo interiéri. Svetlo je väčšinou dodávané pomocou umelého osvetlenia (v prípade autotrofnej alebo mixotrofnej kultivácie), od čoho je aj odvodený názov „fotobioreaktor“. Fotobioreaktory sú uzavreté systémy, v ktorých nedochádza k výmene látok medzi vonkajším prostredím (plyny, kontaminanty) a vnútorným prostredím – kultúrou, ktorá je v reaktore kultivovaná. Typický fotobioreaktor je trojfázový systém tvorený kvapalnou fázou (médium), bunkami, ktoré predstavujú pevnú fázu a plynou fázou [22-24].

Tieto zariadenia poskytujú ochranu pestovanému organizmu hlavne pred kontamináciou inými mikroorganizmami a navyše sa v ňom lepšie udržiavajú stále podmienky, ako napríklad pH, koncentrácia CO_2 a kyslíku alebo teplota. Navyše zabráňujú vyparovaniu vody, takže sa znižuje jej spotreba. Ďalšími výhodami sú menšie straty CO_2 , vyššie koncentrácie buniek organizmu, čo vedie k nižším finančným výdajom a vyššej úrovni produkcie biomasy, a vedľajších produktov. Medzi nevýhody patria vysoké finančné náklady na výrobu a prevádzku samotného bioreaktoru v porovnaní s vodnými nádržami. Vyžadujú chladenie, striktnú kontrolu prívodu kyslíka a nečistôt. Ich využitie sa zvyčajne v praxi obmedzuje len na produkciu vysokohodnotných výtlačkov z rias, ktoré sa nedajú kultivovať v otvorených systémoch [25].



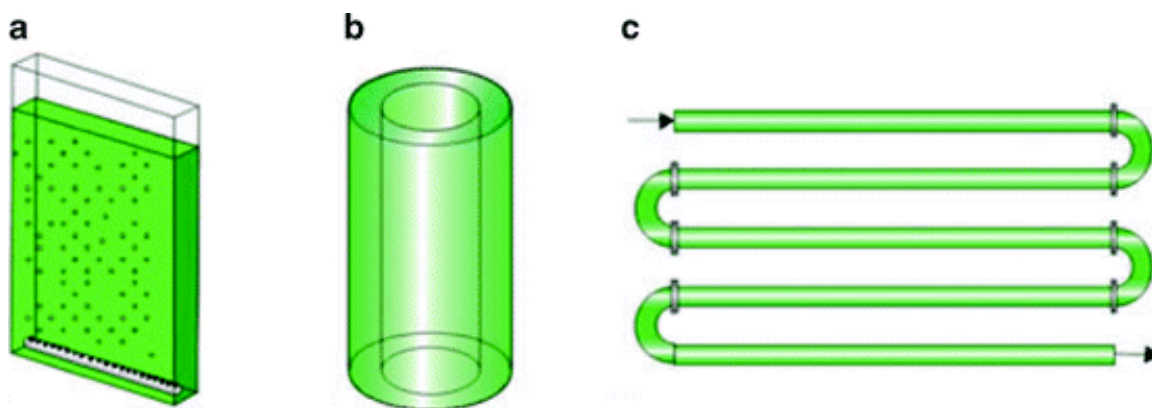
Obrázok 6: Schematické zobrazenie zostavy bioreaktoru [11]

2.2.8.1. *Najvyužívanejšie typy fotobioreaktorov*

Plošné bioreaktory majú najrobustnejšiu konštrukciu. Zjednodušene povedané, ide o dva pláty spojené tak, aby sa vytvoril plochý reaktor s ľubovoľnou dĺžkou dráhy svetla, v rozmedzí od niekoľkých milimetrov až po 70 mm. Miešanie a dodávanie CO₂ sú zabezpečené vstrekom vzduchu obohateného o oxid uhličitý. Pre predstavu, pre reaktor o rozmeroch 0,07 x 1,5 x 2,5 m autori uvádzajú prietok vzduchu 0,25 v/v/min, čo vedie k 150 sekundám ako dobe miešania média. Stále s kladným účinkom na kultúru boli pozorované aj vyššie aerácie do 2 v/v/min. Iným variantom k plošnému reaktoru je horizontálny plošný reaktor, u ktorého je distribúcia svetla zabezpečená deformovaním plátov do cylindrického alebo sférického tvaru. Príkladom je takzvaný dómový reaktor s bublinovou aeráciou [24].

Stĺpcové prebublávané reaktory, „bubble columns“, sú často používané na experimenty v interiéroch. Pre prácu s väčším objemom sa používajú reaktory o priemere > 20 cm, čo spôsobuje vznik tmavej frakcie v strede reaktora. Tým pádom je v tejto časti rast mikrorias obmedzený alebo úplne pozastavený pre nedostatku svetla. Kvôli odstráneniu tejto tmavej časti bola vyvinutá tzv. prstencová kolóna. Skladá sa z dvoch akrylových valcov s výškou 2 m, s priemerom 40 a 50 cm umiestnených jeden vo vnútri druhého tak, aby sa vytvorila prstencová komora. Takýto tvar umožňuje aplikáciu rôznych svietidiel do vnútornej časti reaktora. Čo sa týka prevzdušňovania, používajú sa podobné rozsahy ako u plošných fotobioreaktorov [24].

Tubulárne bioreaktory pozostávajú z priehľadnej rúrky usporiadanej v rovnobežných líniách spojených rozvodmi, tzv. solárnymi kolektormi. Jednotlivé rúrky môžu byť rovné alebo kľukaté, umiestnené v rovine na zemi alebo usporiadané do panelov alebo cievok (špirálový bioreaktor). Rúry majú priemer 10 – 60 mm a dĺžku až niekoľko stoviek metrov. Vďaka tzv. „šošovkovému“ alebo aj „zaostrovaciemu“ efektu je svetlo rozložené homogénne. Dopadajúce svetlo sa rozptyľuje pozdĺž obvodu a je v radiálnom smere zaostrené na os trubice. Týmto spôsobom je exponenciálna strata intenzity svetla, spôsobená vzájomným tienením buniek, čiastočne kompenzované geometricky vynúteným hyperbolickým nárastom intenzity vyžarovanie. Na dosiahnutie tohto javu však treba správne usporiadať trubky. Pumpovanie média je zabezpečené čerpadlami a nesmie presiahnuť rýchlosť 1 m/s. Prekročenie tejto rýchlosti by mohlo viesť k závažnému poškodeniu buniek. Optimálna rýchlosť sa pohybuje v rozmedzí 20 – 50 cm/s. Ďalším testovaným aspektom bol priemer trubice. Ukázalo sa, že kultivácia je so zvyšujúcim sa priemerom efektívnejšia z pohľadu tvorby biomasy, ale toto pravidlo platí len po 40 mm. Pri rúrach väčších ako 40 cm, ktoré boli tiež otestované, boli koncentrácie biomasy veľmi nízke a z pohľadu prevádzkových nákladov sa takéto konštrukcie neodporúčajú. Veľké usporiadania tohto typu môžeme nájsť v Izraeli v púšti Negev, alebo v španielskej Almerii. Najväčšie sa však nachádzajú v Klötze v Nemecku, postavené a prevádzkované firmou Bisantech, kde dĺžka reaktoru údajne dosahuje kombinovane až 500 km [24].



Obrázok 7: Znáozornenie jednotlivých typov bioreaktorov, a) plošný, b) prstencový, c) tubulárny [26]

2.3. Scale up proces

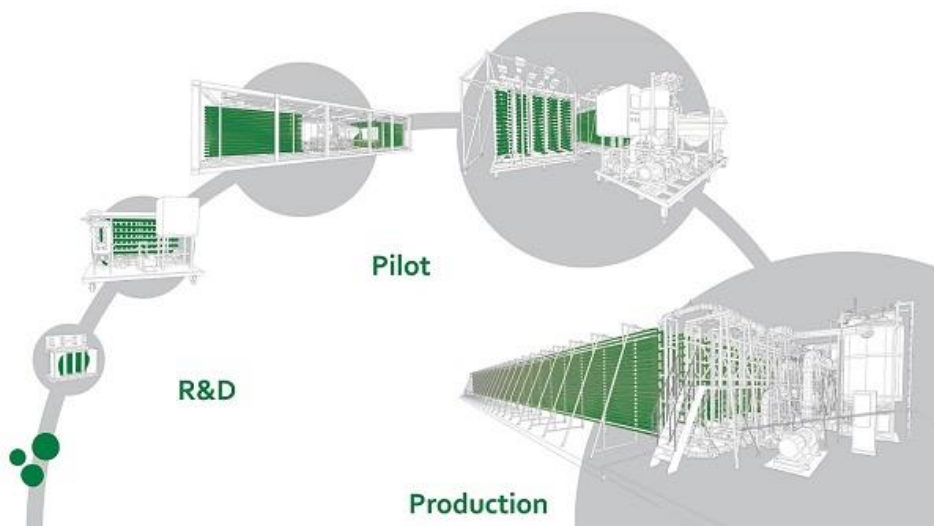
Cieľom scale up procesu je zväčšiť výrobu tak aby bola dosiahnutá rovnaká alebo vyššia produktivita s rovnakou kvalitou výrobku. Na to aby kultivácia rias mohla mať nejaký významnejší sociálny, environmentálny a ekonomický dopad na ľudskú spoločnosť je nutné realizovať ju vo veľkom, teda zvýšiť produkovaný objem. Skladá sa z troch základných krokov: výskum a vývoj, poloprevádzková jednotka a komerčná produkčná jednotka [47].

Scale up proces je kľúčovou témou vo vývoji všetkých procesov. Rozširovanie kultivácie mikrorias z laboratórnej mierky na komerčnú veľkovýrobu je veľkou výzvou kvôli náročnosti odhadu a vymierania faktorov (teplota, svetlo, kyslík, zdroj uhlíka a nutrientov) ovplyvňujúcich scale up proces počas kultivácie. Zväčšovanie riasových kultúr na veľmi veľké objemy je komplexnou úlohou vyžadujúcou skúsený personál. Údržba dlhodobej stabilnej produkujúcej veľkoprevádzky pod vplyvom vonkajších faktorov ako je dážď, teplota, zmena ožiarenia, predstavuje prekážky, ktoré nie sú v konštantnom prostredí laboratória, ktorý je prvým krokom scale up procesu, bežné [47, 48].

Ako prvé je nutné zvážiť ako optimalizovať proces tak, aby bola zabezpečená dostatočná produkcia inokula do nádrže alebo fotobioraktoru s cieľom čo najviac zredukovať čas a finančné náklady. Čo sa týka nákladov, kultivácia jedného kilogramu suchej biomasy vyšla v roku 2011 na zhruba 8 € pre *Chlorella* a približne 4 € pre *Spirulinu*. Z časového hľadiska treba zvážiť krok zväčšovania, takzvaný faktor. Pri kultivácii rias je najzaužívanější faktor 10 per krok. To znamená, že ak kultivácia začína na 10 ml pokračuje 100 ml, potom na 1 l, 10 l, a tak ďalej. Na to aby riasa dosiahla dostatočný nárast k ďalšiemu kroku, je nutné čakať aspoň 5 dní. To znamená, že na dosiahnutie dostatočného množstva inokula pre veľkoprodukciiu o 10 000 l a kultivácia začala na 10 ml, je potrebný minimálne jeden mesiac (pri použití faktoru 10) na spustenie produkčnej jednotky. Aby sa minimalizovala potreba reinokulácie zo zásobnej kultúry je tiež potrebné zabezpečiť aby nedošlo ku kontaminácii alebo kolapsu kultúry. Vzhľadom na to, že scale up proces sa skladá z mnohých medzikrokov, sa toto riziko zvyšuje. Prítomnosť mnohých rizikových faktorov vyžaduje efektívny monitorovací systém kultúry, ktorý poskytuje včasné varovanie akéhokoľvek problému, takže môžu byť aplikované rýchle opatrenia, ktoré zabránia kolapsu kultúry. Vizuálny monitoring je však mnohokrát nedostatočný a dokáže detegovať len väčšie zmeny v kultúre. Najbežnejšie monitorované

parametre, okrem teploty a svetla, sú pH a koncentrácia O₂. Obe sa totiž menia predvídateľným spôsobom počas celej doby aktívneho rastu mikrorias. Akákoľvek odchýlka indikuje problémy s kultúrou [48, 49].

Ako poloprevádzky ale aj veľkoprodukčné jednotky sa využívajú uzavreté fotobioreaktory, alebo otvorené nádrže. Detailnejší opis oboch zmienených je uvedený v kapitolách 2.2.7 Kultivácia v otvorenom systéme a 2.2.8 Fotobioreaktory [49].



Obrázok 8: Schéma scale up procesu [50]

2.4. Optimalizácia podmienok rastu a produkcie mikrorias

Existuje rad faktorov ovplyvňujúcich rast mikrorias. Na dôležitosť jednotlivých faktorov sa prihliada podľa účelu kultivácie biomasy a konkrétneho kultivovaného druhu alebo dokonca kmeňa riasy. Vo všeobecnosti platí, že riasy nie sú náročné organizmy a možno ich kultivovať aj pri použití malého množstva živín. Medzi najdôležitejšie faktory ovplyvňujúce tvorbu biomasy a vedľajších produktov abiotického charakteru patria teplota, živné médium a nutrienty, svetlo a svetelné periódy, pH, aerácie, miešanie a typ použitej mikroriasy. Hoci sa medzi riasami nachádzajú aj extrémofyly, a každá riasa preferuje iné prostredie, existujú určité všeobecné podmienky pre kultiváciu rias (Tabuľka 1). Detailnejšie sa budem venovať jednotlivým faktorom v nasledujúcich podkapitolách, pričom diskutované optimá sa týkajú väčšiny typických mikrorias a sú výrazne odlišné od optim pre extremofilné riasy [27].

Tabuľka 1: Všeobecné kultivačné podmienky vhodné pre mikroriasy [28]

Parametre		Rozsah	Optimum
Teplota	[°C]	16 - 27	18 - 24
Salinita	[g.l ⁻¹]	12 - 40	20 - 24
Intenzita svetla	[lux]	1 000 – 10 000	2 500 – 5 000
Cyklus svetla	svetlo : tma [h]	-	16:8 (minimum) 24:0 (maximum)
pH	-	7 - 9	8,2 - 8,7

2.4.1. Svetlo

Mikroriasy sú fotosyntetizujúce organizmy. To znamená, že spotrebúvajú anorganický uhlík a premieňajú ho na organické látky a kyslík. Svetlo je zdroj energie, ktorá poháňa túto reakciu a jej rýchlosť a kvalita závisia na jeho intenzite a spektre. Považujúc svetlo za najdôležitejší zdroj energie u fotoautotrofných rias, vzniklo veľa štúdií zaoberajúcich sa práve vplyvom intenzity svetla. Okrem intenzity je podstatná aj vlnová dĺžka [29].

2.4.1.1. Cyklus svetla

Dĺžka svetelného cyklu je veľmi dôležitým kritériom, ktoré musí byť zahrnuté pri zostavovaní fotobioreaktoru. Periódy svetla majú významný vplyv na fotosyntézu a rýchlosť rastu, ale treba brať do úvahy, že pri nadmerné vystavenie svetlu dochádza k plytvaniu elektriny a spomaleniu rastu buniek. V porovnaní s 3 h, 6 h a 9 h svetelnými cyklami došlo pri 12 h cykle takmer k zdvojnásobeniu koncentrácie biomasy. Zistilo sa, že rýchlosť rastu a maximálna hustota buniek rias rastie úmerne s dĺžkou svetelného cyklu nezávisle od intenzity svetla. Výnimkou bol cyklus 12:12 h (svetlo : tma), kedy kultúra vykazovala vyššiu produktivitu a maximálne hodnoty hustoty buniek v porovnaní s cyklom 14:10 h (svetlo : tma). Je preukázané, že pri autotrofnom spôsobe kultivácie je svetlo nutnosťou. Pri vystavení *Chlorella sp.* len tme nevykazovala táto riasa žiadne známky rastu [16] [30-32].

2.4.1.2. Intenzita svetla

Okrem zdroja svetla je tiež veľmi dôležitá i jeho intenzita. Pri skúmaní vplyvu intenzity svetla za použitia TL5 lampy sa rýchlosť rastu buniek *C. vulgaris* začala spomaľovať pri vystavení svetlu o intenzite vyššej ako 18 W/m^2 . Toto pozorovanie potvrdilo závery zo štúdie z roku 2000, vedené Ogbonom a Tanakom. Najvyššia rýchlosť rastu bola dosiahnutá práve pri svetle o intenzite 18 W/m^2 , konkrétne $1,606 \text{ deň}^{-1}$. Pri intenzite 9 W/m^2 bolo maximum $1,301 \text{ deň}^{-1}$. Z hľadiska efektivity by teda bolo výhodnejšie používať intenzitu 9 W/m^2 , čím by sa znížili aj náklady na elektrickú energiu. Chang a spol. zase vyhodnotil ako najefektívnejšiu intenzitu $120 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, čo je približne $26,16 \text{ W/m}^2$, kedy rýchlosť rastu dosahovala hodnoty $1,872 \text{ deň}^{-1}$, pričom použitá lampa bola tiež fluorescenčná. Iná štúdia tvrdí, že pri použití LED svetla môže byť maximálna intenzita svetla, pri ktorej nedochádza k spomaleniu rastu, až 400 W/m^2 . Pri takomto osvetlení dosiahol maximálny rast buniek *C. vulgaris* hodnotu $0,840 \text{ deň}^{-1}$. Ak by sme porovnali spotrebu a produkt, je táto metóda určite neefektívnejšia a dokazuje iba, že *C. vulgaris* znesie aj väčšiu intenzitu svetla pri inom zdroji osvetlenia [33 - 35].

2.4.1.3. Zdroj svetla

Chlorella sp. obsahuje pigmenty, hlavne chlorofyl a karotenoidy, ktoré zachytávajú vlnovú dĺžku v rozsahu 400 – 500 nm a 650 – 700 nm. Pri porovnaní voľfrámovej (700 - 850 nm) a fluorescenčnej lampy (450 – 650 nm) je efektívnejšie použitie práve druhej lampy. Pri kultivácii *Chlorella vulgaris* s použitím lúč s konkrétnymi farebnými spektrami – modrá (476 nm), zelená (510 nm), červená (650 nm) a s klasickým bielym svetlom bolo preukázané, že červené a zelené svetlo nie je veľmi efektívne z pohľadu rastu koncentrácie biomasy v exponenciálnej fáze. Experiment s modrým svetlom sa síce priblížil koncentrácií biomasy pod bielym svetlom, ale vyžadoval dlhší aklimatizačný čas. V tomto ohľade je teda

najefektívnejšie využiť biele svetlo. Pri kombináciách s vyššími intenzitami však môže byť efektívne pre *C. vulgaris* aj červené svetlo. Rovnako efektívne sa červené svetlo preukázalo aj pri kultivácii *C. pyrenoidosa* [29, 33].

2.4.2. Teplota

Teplota ovplyvňuje rýchlosť všetkých chemických reakcií súvisiacich s metabolizmom a rastom rias. Teplotné zmeny pôsobia na biochemické zloženie buniek, konkrétne lipidov a proteínov. Teploty nad 30°C negatívne ovplyvňujú rast buniek *Chlorelly sp.* Pri teplote 35 °C začínajú vykazovať pokles rýchlosti rastu asi o 17 %. Zvyšovanie teploty (38 °C) vedie k smrti riasových buniek. Bolo dokázané že optimálna teplota pre rast väčšiny druhov rias je medzi 20 °C – 30 °C. Pri inom výskume bol najrýchlejší rast dosiahnutý pri teplote 32,4 °C. Išlo však o *C. vulgaris* kultivovanú v zmiešanej kultúre, pričom hlavnou zložkou živného média bol uhlík v organickej forme – glukóze (koncentrácia 0,75 mg/l). Pri väčšine experimentov sa však udržiava teplota okolo tej laboratórnej, to znamená 25 °C [29, 36].

Chlorella je relatívne citlivá na zmeny teploty. Ak teploty klesnú nízko, má tendenciu spaľovať cenné kalórie. Najlepšie optimum pre jej rozmnožovanie je okolo 25 °C. Z toho vyplýva, že v noci potrebuje zahrievanie a cez deň klimatizáciu. Je to tiež jeden z dôvodov, prečo je v súčasnosti stále ekonomicky náročné pestovať tieto riasy vo veľkom na účely akými je napríklad výroba biopalív [6].

2.4.3. pH

Hodnota pH, ktorú má kultúra na počiatku, môže mať veľký vplyv na koncentráciu biomasy a produkciu lipidov u niektorých kmeňov mikrorias. Pri prekročení pH 9 môže dôjsť dokonca k vyzrážaniu vápenatých solí. Mayo v roku 1997 zistil, že *Chlorella vulgaris* toleruje nízke pH, a dokáže prežiť i pri pH 3. Vyplývajú z jeho výskumu sa riasie darilo najlepšie pri pH 6,31 - 6,84. Maximálne dosiahnuté pH (pH = 11) už na rast *C. vulgais* vplývalo negatívne. V inej štúdii sa ukázalo, riasy všeobecne sa pri pH vyššom ako 8 prestávajú rozmnožovať a rýchlosť rastu klesá. Hodnotu pH ovplyvňuje hlavne živné médium, v prípade BG-11 je to približne 7,4 a u BBM približne 6,6. To je aj dôvod, prečo vo väčšine štúdií narazíme na pH prostredia od 6 – 7,5 [22, 29, 33, 35, 37, 38].

2.4.4. Živné médium

Zloženie živného média má výrazný vplyv na rast rias a finálnu koncentráciu biomasy. Je známe, že najhojnejší rast mikrorias prebieha v nutrične bohatých, tzv. eutropických, vodách. Medzi jeden z najdôležitejších a najskúmanejších prvkov, dôležitých pre život kultúry, patrí dusík. Bolo dokázané, že ak sa v médiu nachádza vo forme amoniaku (NH_4Cl) a súčasne vo forme dusičnanu (KNO_3), ako prvý je *C. vulgaris* spotrebovaný dusík z amoniaku a až potom z prítomných dusičnanov [10,39].

Ďalšou významnou látkou je NaHCO_3 , ktorá slúži ako zdroj anorganického uhlíka. Vo viacerých štúdiách sa preukázalo, že zvýšenie jeho koncentrácie podporuje rast *C. vulgaris*. Pri použití koncentrácií od 100 – 1 600 mg/l (krok 100), rástla produkcia biomasy úmerne s prídavkom hydrogén uhličitanu, až po dosiahnutie maximálnej koncentrácie biomasy 0,6 g/l pri použití 1 200 mg/l. Pri vyšších koncentráciách NaHCO_3 začalo dochádzať k nepatrnému

úbytku biomasy, pravdepodobne kvôli zvyšujúcemu sa pH (>11). Viacero podobných experimentov dokázalo, že je vhodnejšie použiť NaHCO_3 ako Na_2CO_3 [33].

Medzi najčastejšie používané médiá patrí BBM (Bold's Basal Medium), BG11 - médium (Blue – Green Medium), SGM (synthetic wastewater medium), WC médium, Chu #10 médium, V médium atď. Mnoho štúdií sa tiež zaoberá použitím SGM (synthetic wastewater medium). Najviac výskumov sa vykonáva práve v BBM a BG11. Z mnohých štúdií vyplýva, že médium BG11 je oproti BBM efektívnejšie. [23,32].

Veľmi dôležitým aspektom, ktorému bolo venovaných mnoho výskumov, sú ekonomické náklady na kultiváciu. V roku 2013 skúmal M.F.Blair použitie nutrične ochudobneného média 3N-BBM. Médium BBM prešlo rôznymi modifikáciami navrhnutými tak, aby vyhovovalo špecifickým požiadavkám rôznych druhov a kmeňov rias. Do tejto skupiny patrí aj 3N-BBM, ktoré je trojnásobne obohatené na dusičnany. Blair pri kultivácii *C. vulgaris* využil toto médium, ale so zníženou koncentráciou makronutrientov na 25% a 50% a výsledky kultivácie porovnával s kultiváciou v 100% médiu. Zatiaľ čo pri použití 50% a 25% média bola zahájená takmer okamžite log fáza, 100% médium takúto dráhu nezaznamenalo, čo viedlo k predpokladu, že v odporúčanom zložení je koncentrácia niektorých látok zbytočne vysoká. 50% médium udržiavalo log fázu aj v dvanásty deň, 25% vstúpilo do stacionárnej fázy na jedenásty deň. 100% médium dosiahlo najvyšší objem biomasy na 4. deň (0,0475 g/l za deň), 50% na 8. deň (0,0525 g/l za deň) a 25% na 7. deň (0,0893 g/l za deň). Najvyššia rastová rýchlosť u 50% a 100% média bola rovnaká a nastala v 4. deň u oboch prípadov ($0,38 \text{ d}^{-1}$). Experiment trval 12 dní, použité bolo biele svetlo. Pokus s 50% médiom bol predĺžený na 14 dní a kultúra bola v stave log fázy aj v 14. deň. Z experimentu vyplýva, že 50% zloženie média je dostačujúce a jeho redukcia je ďalším krokom k zníženiu finančnej náročnosti pestovania chlorelly [29].

2.4.5. CO₂ ako zdroj uhlíka

Vzduch všeobecne obsahuje približne 0,04 % CO₂. Takéto množstvo nezodpovedá kritériám pre množstvo uhlíka potrebného na fotosyntézu rias. Vzhľadom na to, že oxid uhličitý je hlavným plynom, spôsobujúci skleníkový efekt a jeho koncentrácia sa stále zväčšuje (predpokladané množstvo na rok 2100 je 26 miliárd ton, pričom v roku 1997 bolo nameraných „len“ 7,4 miliardy ton) došlo k mnohým snahám o redukciu tohto plynu v atmosfére. Jednou z možností zníženia obsahu oxidu uhličitého môže byť použitie mikrorias. Tie konvertujú CO₂ na biomasu. Mikroriasy využívajú CO₂ veľmi efektívne, pretože rýchlo rastú a môžu byť pomerne ľahko pestované v rôznych systémoch, ako napríklad vo fotobioreaktoroch [40].

2.4.5.1. Efekt CO₂ na rast pri rôznej hustote buniek

Rýchlosť viazania oxidu uhličitého je priamo závislé na hustote riasy a rýchlosť viazania CO₂ zasa ovplyvňuje rýchlosť rastu buniek riasy. V roku 2007 použil Sheng-Yi a spol. 2 druhy inokula. Inokulum s hustotou $8 \cdot 10^5$ buniek na 1 ml a inokulum s hustotou $8 \cdot 10^6$ buniek na 1 ml. Obe kultúry boli prevzdušnené rôznymi koncentraciami CO₂. Pri oboch typoch sa ukázalo ako najefektívnejšie prevzdušnenie pri obsahu 2% CO₂. Množstvo biomasy bolo 1,211 g/l pre kultúru s nižšou hustotou a 1,445 g/l pre kultúru s vyššou hustotou. Rýchlosť rastu bola $0,492 \text{ deň}^{-1}$ pre nižšiu a $0,605 \text{ deň}^{-1}$ pre vyššiu hustotu. Z pokusu vyplýva, že efektívnejšie je

použiť kultúru s vyššou koncentráciou buniek. To, že tolerancia rias na CO₂ a odpadové plyny je závislá na hustote buniek potvrdzujú aj iné štúdie [40].

2.4.5.2. Efekt CO₂ na rast buniek

Existujú štúdie, v ktorých vedci porovnávajú rôzne koncentrácie CO₂ na rast buniek *Chlorella vulgaris*. V jednom z takýchto experimentov bolo dokázané, že počas prvých 40 hodín kultivácie sa rast líšil len nebadane. Po 70 hodinách sa však ukázalo, že kultúra s 1% obsahom CO₂ dosiahla najvyššiu koncentráciu (0,75 g/l) a kultúra s 6% a 12% dosahovali najmenej (0,65 g/l). Tento pokus taktiež dokázal, že hoci sú riasy schopné rásť aj bez pridaného CO₂, ich rast je pomalší [41].

Riasy sú však natoľko adaptívne, že je možné ovplyvniť ich toleranciu na koncentrácie CO₂. Napríklad u riasy *Nannochloropsis oculata*, ktorá nebola schopná prežiť pri koncentráciách vyšších ako 5%, zistili, že ak ju pred naočkovaním vystavia podmienkam s 2% CO₂, bolo takéto inokulum neskôr schopné rastu aj pri koncentráciách 15% CO₂. Obdobný pokus bol vykonaný aj na *Chlorella sp.* Tá normálne vykazuje inhibície rastu už od 10% CO₂. Avšak, ak bola ešte pred naočkovaním adaptovaná na 2% CO₂ a nedošlo k žiadnemu poškodeniu riasy, ani zastaveniu rastu, rástla táto riasa aj pri koncentráciách 15% CO₂. Rozdiel bol v schopnosti produkcie biomasy - pri 2% to bolo 1,055 gramu suchej biomasy za deň a pri 15% výrazne menej, len 0,74 g/l za deň [40, 41].

V tomto prípade je teda vhodné zamerať sa na jeden cieľ. Buď optimalizovať podmienky tak, aby rozmnožovanie riasy a výsledná produkcia biomasy bola čo najvyššia, to znamená použitie nižšej koncentrácie CO₂ alebo použiť vyššie koncentrácie oxidu uhličitého, pričom riasa je schopná akumulovať maximum 1,8 kg CO₂/1 kg biomasy, a tým znížiť jej produkciu [11].

3. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

3.1. Použité chemikálie, prístroje a mikroorganizmy

V nasledujúcich kapitolách sú uvedené tabuľky s chemikáliami, prístrojmi a mikroorganizmami, ktoré boli využité v experimentálnej časti.

3.1.1. Použité chemikálie

$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ p.a	PENTA s.r.o
$\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ p.a	PENTA s.r.o
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	PENTA s.r.o
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ p.a	PENTA s.r.o
Glukóza	PENTA s.r.o
H_3BO_3	PENTA s.r.o
KH_2PO_4 p. a	PENTA s.r.o
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ p. a	PENTA s.r.o.
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	PENTA s.r.o
NaNO_3	PENTA s.r.o
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ p.a	PENTA s.r.o.

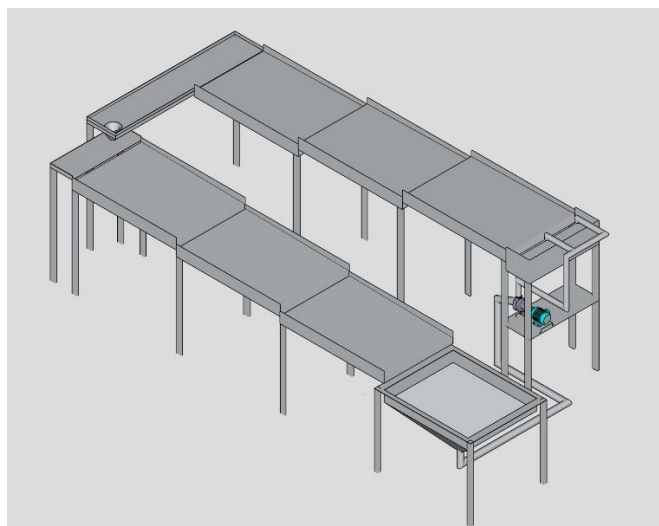
Ďalej boli použité chemikálie bežne dostupné v laboratóriu.

3.1.2. Použité laboratórne zariadenie

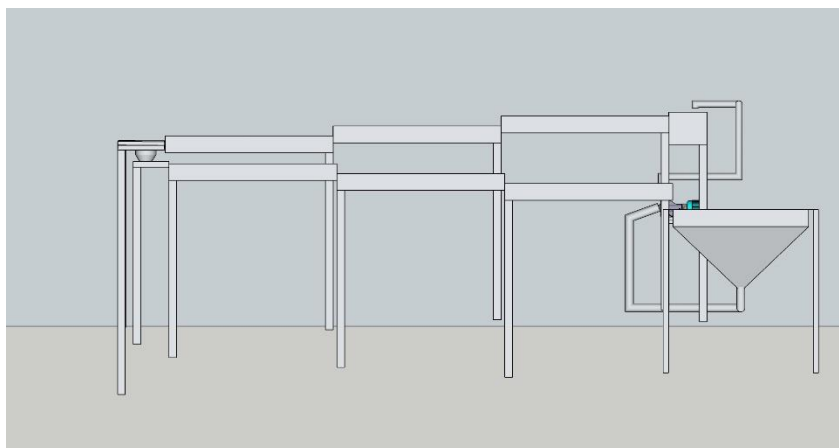
Analytické váhy	Adam equipment, USA
Autokláv	SANYO Labo Autoclave, USA
Automatické pipety	Vitrum, VWR, CZ
Centrifuga	Spectrafuge 6C, Labnet International, USA
Flowbox	Safe FAST Classic 212, Itálie
Kultivačné fľašky	CELLSTAR®, greiner bio-one, Nemecko
Kultivátor	SANYO Gallenkamp, USA
Spektrofotometer	Spekol 11, Carl Zeiss AG, Nemecko
Sušička	Chirana HS 62A, ČR
Skrížený gradient	Briklis, spol s.r.o., ČR
Trepačka	yellow line RS10 basic, IKA®, Nemecko

3.1.2.1. Kultivačná kaskádová plošina

Kultivačná kaskádová plošina, alebo aj plošinový bioreaktor, je zariadenie slúžiace na kultiváciu mikrorias vo vonkajších podmienkach v poloprevádzkovom režime. Médium s riasami tvoriace tenkú, niekoľko milimetrov hrubú vrstvu, preteká po celej ploche reaktoru do zbernej bane, odkiaľ je pomocou čerpadla prepumpované opäť na plošinu a cyklus sa opakuje. Je nevyhnutné aby roztok dosahoval turbulentného toku, aby nedochádzalo k usádzaniu rias na dno a napokon aj na samotnú plošinu. Pre lepšiu predstavu plošiny sú priložené obrázky (Obrázok 9 a Obrázok 10) modelu zariadenia, ktoré som vytvorila v programe SketchUp, software pre tvorbu 3D modelov.



Obrázok 9: 3D model kaskádovej plošiny zvrchu, pripravené v programe SkatchUp



Obrázok 10: Model kaskádovej plošiny zboku, pripravené v programe SkatchUp

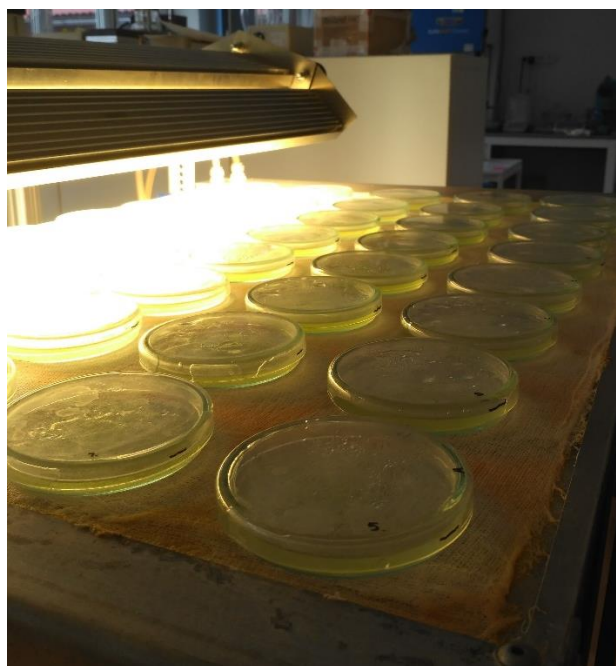
3.1.2.2. *Skrížený gradient*

Skrížený gradient je zariadenie schopné kombinovať dva rastové faktory, teplotu a intenzitu osvetlenia. Toto zariadenie bolo použité pri pokusoch optimalizácie rias *Chlorella sp.* kmeňa C1A a *Coccomyxa*, v kapitole 4.4.1 a 4.4.2. Skrížený gradient pozostáva z hliníkovej platne, na ktorú sa umiestňujú skúmané vzorky. Teplotu je možno regulovať vďaka vyhrievacej špirále, ktorá je umiestnená na ľavej strane a chladiacej tekutine, ktorá prúdi napravo. Umiestnenie týchto jednotiek na konce dosky spôsobuje ochladenie v smere doprava alebo naopak postupné otepľovanie v smere k vyhrievacej špirále, čo vytvára rovnomerný teplotný gradient naprieč celou hliníkovou plochou. Teplotné spektrum je možné vidieť na Obrázok 11.



Obrázok 11: Zobrazenie regulácie teploty na skríženom gradiente

Princíp rôznej intenzity svetla je jednoduchý. Vo vrchnej časti zariadenia je umiestnená lampa, ktorá intenzívne osvetľuje vzorky priamo pod ňou. Smerom nadol, teda ďalej od zdroja žiarenia, svetla ubúda - klesá jeho intenzita. Jav je zobrazený na Obrázok 12.



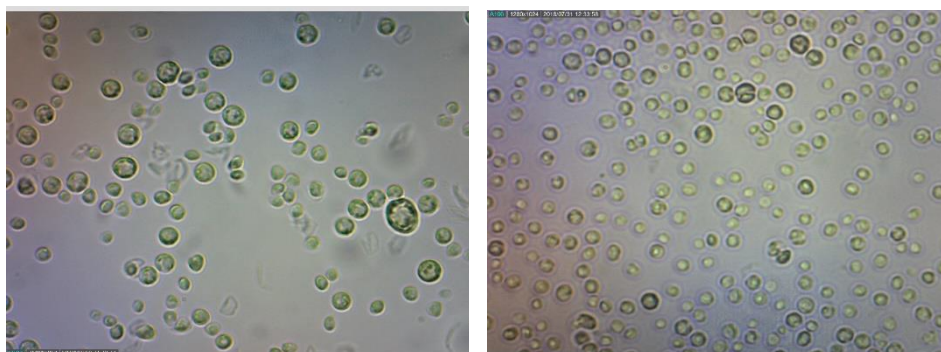
Obrázok 12: Rozdiel intenzít svetla na skríženom gradiente

3.1.3. Použité mikroorganizmy

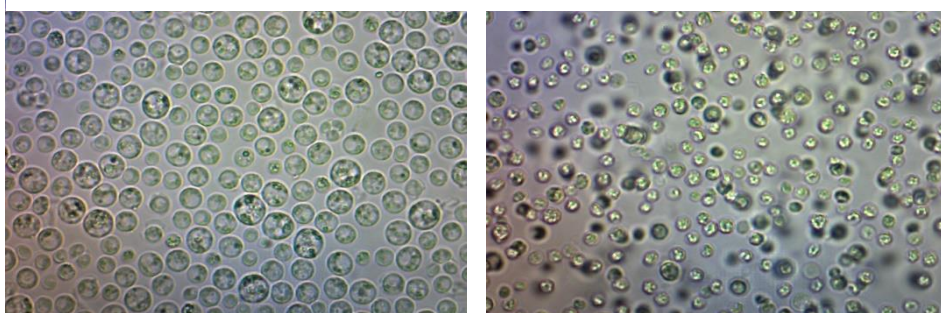
V kapitole je uvedený zoznam použitých mikroorganizmov, ich taxonomické zaradenie (Tabuľka 2, Tabuľka 3) a fotky získané 600násobným zväčšením na mikroskope (Obrázok 13, Obrázok 14, Obrázok 15 a Obrázok 16).

Tabuľka 2: Zoznam použitých kmeňov a ich taxonomické zaradenie [42]

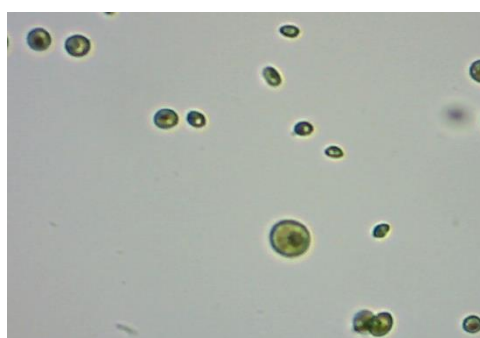
Kmeň riasy	Názov riasy	Taxonómia riasy
H14	<i>Chlorella</i>	<i>Eukaryota</i>
		Oddelenie
		<i>Chlorophyta</i>
		Trieda
		<i>Trebouxiophyceae</i>
		Rad
		<i>Chlorellales</i>
255	<i>Chlorella</i>	<i>Eukaryota</i>
		Oddelenie
		<i>Chlorophyta</i>
		Trieda
		<i>Trebouxiophyceae</i>
		Rad
		<i>Chlorellales</i>
C1A	<i>Chlorella</i>	<i>Eukaryota</i>
		Oddelenie
		<i>Chlorophyta</i>
		Trieda
		<i>Trebouxiophyceae</i>
		Rad
		<i>Chlorellales</i>
G11	<i>Chlorella</i>	<i>Eukaryota</i>
		Oddelenie
		<i>Chlorophyta</i>
		Trieda
		<i>Trebouxiophyceae</i>
		Rad
		<i>Chlorellales</i>
	<i>Coccomyxa</i>	<i>Eukaryota</i>
		Oddelenie
		<i>Chlorophyta</i>
		Trieda
		<i>Trebouxiophyceae</i>
		Rad
		<i>Trebouxiophyceae ordo incertae sedis</i>



Obrázok 15: Zľava: Chlorella 255 a C1A, zväčšenie 600x



Obrázok 14: Zľava: Chlorella G11 a H14, zväčšenie 600x

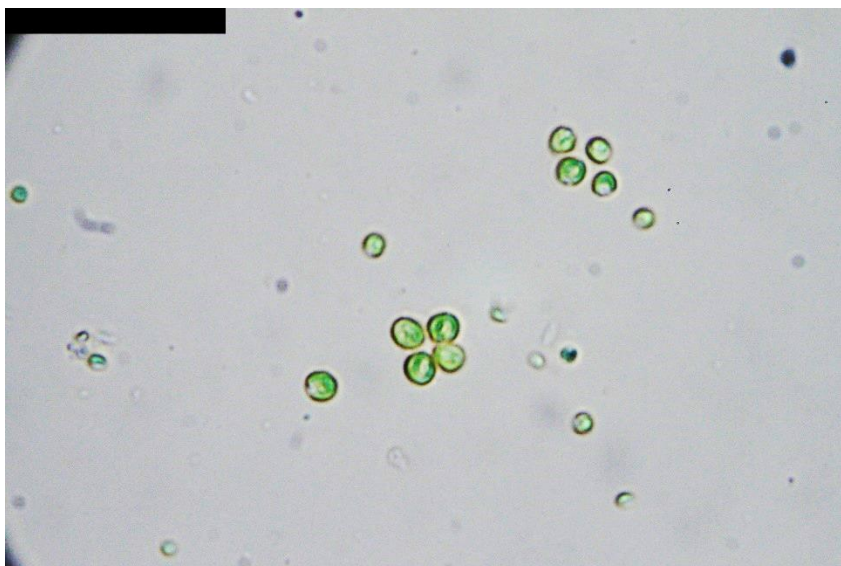


Obrázok 13: Coccomyxa, zväčšenie 600x

Okrem kultivácie v sterilných kontrolovaných podmienkach, ktorá sa týkala mikroorganizmov uvedených v Tabuľka 2, bola vykonaná aj kultivácia na plošine v exteriéry. Pre tento pokus bola využitá riasa *Dictyosphaerium chlorelloides* kmeň CCALA 330.

Tabuľka 3: Taxonomické zaradenie *Dictyosphaerium chlorelloides* [42]

Kmeň riasy	Názov riasy	Taxonómia riasy
CCALA 330	<i>Dictyosphaerium chlorelloides</i>	<i>Eukaryota</i>
		Oddelenie
		<i>Chlorophyta</i>
		Trieda
		<i>Trebouxiophyceae</i>
		Rad
		<i>Chlorellales</i>



Obrázok 16: Dictyosphaerium chlorelloides, zväčšenie 600x

3.2. Kultivačné média

3.2.1. Heterotrofné chlorellové médium

Pre heterotrofnú kultiváciu mikrorias bolo použité heterotrofné chlorellové médium, ktorého zloženie je uvedené v Tabuľka 4. Rovnaké médium bolo použité aj pri kultivácii kmeňa C1A na skríženom gradiente. pH média sa pohybovalo v neutrálnych hodnotách. Zloženie média bolo prevzaté z Mikrobiologického ústavu AV ČR, z vedeckého pracoviska v Třeboni.

Na autotrofnú kultiváciu bolo použité rovnaké médium ako na heterotrofnú kultiváciu, teda heterotrofné chlorellové médium, ale bez prídavku glukózy. Jeho zloženie možno vidieť v Tabuľka 5.

Tabuľka 4: Zloženie heterotrofného chlorellového média

Zlúčenina	Koncentrácia [g/l]
Makroelementy	
Glukóza	20
NaNO ₃	2,597
KH ₂ PO ₄	0,422
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,313
Mikroelementy	
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,0249
H ₃ BO ₃	0,0057
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,0016
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,0022
CoSO ₄ .7H ₂ O	0,0019
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,0026
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	0,0009

Tabuľka 5: Zloženie média použitého na autotrofnú kultiváciu

Zlúčenina	Koncentrácia [g/l]
Makroelementy	
NaNO ₃	2,597
KH ₂ PO ₄	0,422
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,313
Mikroelementy	
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,0249
H ₃ BO ₃	0,0057
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,0016
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,0022
CoSO ₄ ·7H ₂ O	0,0019
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0,0026
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	0,0009

3.2.2. Florium

Florium, alebo „žížalový čaj“, je čisto prírodný produkt dážďoviek, ktorý neškodí rastlinám ani v koncentrovanej forme. Vyrábajú ho dážďovky prirodzenou cestou. Vďaka tomu obsahuje prospešné látky v natívnej forme, ktoré sú lepšie vstrebateľné (80-90%). Florium neobsahuje patogény ani toxické prvky. Obsahuje dusík, draslík, fosfor, vápnik, horčík, sodík, meď, zinok, mangán, a bór. Okrem toho obsahuje radu iných významných látok: vitamíny, enzýmy (stimulátory rastu), auxíny (naťahovanie buniek), cytokiníny (delenie buniek), gibereliny a voľné aminokyseliny, huminové kyseliny a mycorhizae - prospešné pôdne huby. Obsah niektorých látok v médiu je uvedený v Tabuľka 6. Použitím tohto výrobku ako média na kultiváciu rias by bolo legislatívne možné pripraviť produkty s označením BIO [43].

Tabuľka 6: Zloženie produktu Florium

Vlastnosť	Hodnota
Sušina v %	1,0
Celkový dusík jako N v %	0,1
Celkový fosfor jako P v %	0,1
Celkový draslík jako K v %	0,2
Hodnota pH	7,7

3.2.3. Porovnanie zloženia použitých kultivačných médií

Vzhľadom na výrazne odlišné výsledky kultivácii v závislosti na použitom médiu, boli vypočítané zastúpenia makronutrientov v týchto médiách. Vypočítané koncentrácie sú uvedené v Tabuľka 7.

Tabuľka 7: Koncentrácia makronutrientov v jednotlivých médiách

Makronutrienty	Chlorellové médium	Florium 20x zriedené	Florium 50x zriedené
N [g/l]	0,428	0,05	0,02
P [g/l]	0,096	0,05	0,02
K [g/l]	0,121	0,10	0,04

Z uvedených čísel je možné vidieť výrazný rozdiel medzi koncentraciami dusíka, čo bol zjavne kľúčový faktor rozdielov v kultivácii mikrorias.

3.3. Použité metódy

Nasledujúce kapitoly boli venované metódam a postupom použitým v experimentálnej časti. Bol opísaný spôsob a podmienky kultivácie a metódy merania rastu mikrorias. Vo všetkých prípadoch sa jednalo o kultiváciu typu batch.

3.3.1. Heterotrofná kultivácia

V heterotrofnej kultivácii boli použité kmene Chlorella H14, C1A a G11. Ako prvé boli kultivované inokulá, získané zaočkovaním čistej kultúry z agaru do heterotrofného chlorellového média. Inokulum rástlo pri teplote 30°C, prirodzenom osvetlení a bolo premiešavané na trepačke po dobu 7 dní. Bola zmeraná absorbancia inokúl pri vlnovej dĺžke 750 nm. Inokulum kmeňa G11 dosahovalo absorbanciu o hodnote 14,02. Kmene C1A a H14 dosiahli hodnotu 6,34.

Na kultiváciu sa použilo 5 ml inokula a 100 ml média, pričom pre každý kmeň boli použité tri druhy médií - heterotrofné chlorellové médium a 50 krát a 20krát zriedený roztok prípravku Florium (žižalice) s prídavkom glukózy (20 g.l⁻¹). Suspenzia v 250 ml Erlenovej banke bola umiestnená do kultivátora, kde rástla pri teplote 25°C, stálom premiešavaní a bez prísunu svetla. Rast kultúry bol sledovaný pravidelným meraním biomasy po dobu 11 dní.

3.3.2. Autotrofná kultivácia

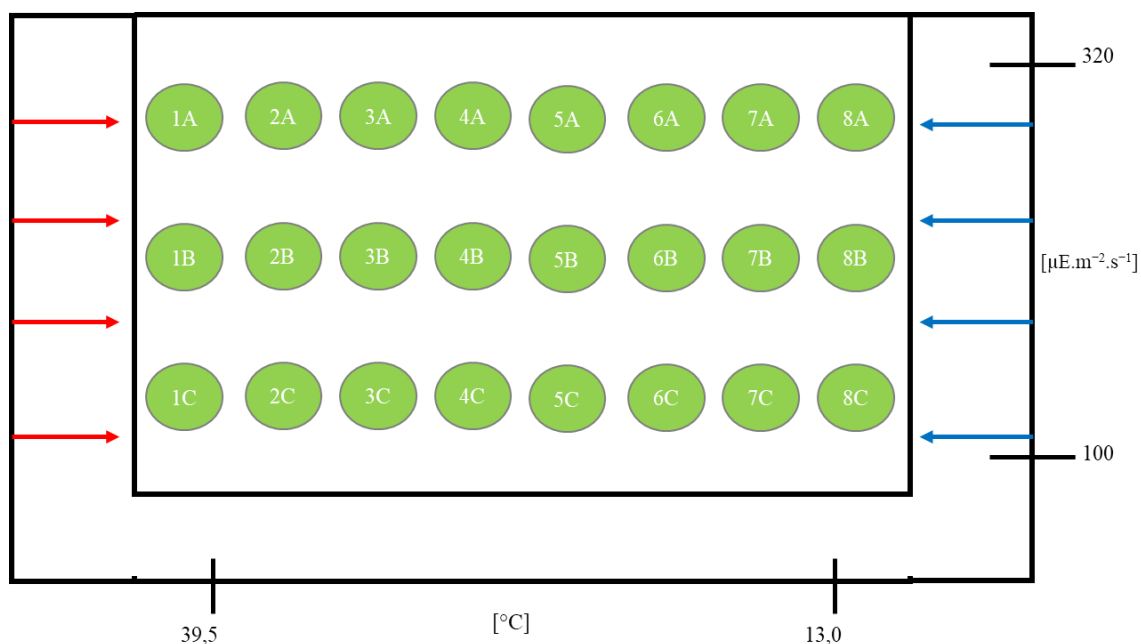
Na autotrofnú kultiváciu boli vybraté kmene H14, 255 a Coccomyxa. Postup získania inokula pri kmeni H14 bol rovnaký ako v predchádzajúcom prípade. Inokulum pre kmeň 255 bolo získané obdobne, ale za použitia heterotrofného chlorellového média bez glukózy. Inokulum kmeňa Coccomyxa bolo obdržané z Botanického ústavu AV ČR v Průhonicích. Podmienky rastu boli rovnaké ako v prípade inokúl pre heterotrofnú kultiváciu. Dosiahnuté absorbancie, pri vlnovej dĺžke 750 nm, boli nasledovné: 255 dosahovalo hodnoty 5,54, Coccomyxa 1,31 a H14 6,34.

Na kultiváciu sa použilo 5 ml inokula a 100 ml média, pričom pre každý kmeň boli použité tri druhy médií - heterotrofné chlorellové médium bez glukózy a 50 krát a 20krát zriedený roztok prípravku Florium (žižalice). Suspenzia v 250 ml Erlenovej banke bola umiestnená do kultivátora, kde rástla pri teplote 25°C, osvetlení o intenzite 200 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ a stálom premiešavaní. Rast kultúry bol sledovaný pravidelným meraním biomasy po dobu 11 dní.

3.3.3. Kultivácia na skríženom gradiente

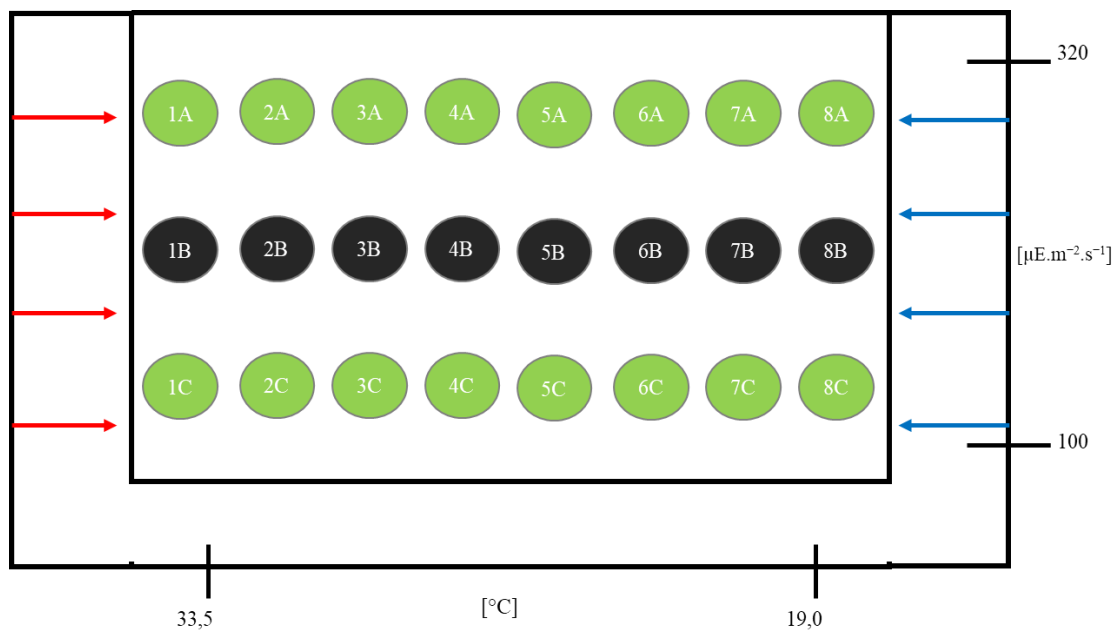
Na skríženom gradiente kombinujúcom rôzne hodnoty intenzity svetla a teploty boli kultivované riasy *Chlorella* kmeň C1A a *Coccomyxa*. Obrázok 17 a Obrázok 18 znázorňujú schému rozloženia.

900 ml inokula *Coccomyxy* o $A_{750} = 0,222$ bolo zriedených s 300 ml heterotrofného chlorellového média bez glukózy, jednalo sa teda o fotoautotrofnú kultiváciu. 35 ml suspenzie bolo naliatej do 24 sterilných suspenzných 250 ml plastových fľašiek s filtrom. Kultivácia prebiehala v rozmedzí teplôt $39,5\text{ }^{\circ}\text{C} - 13\text{ }^{\circ}\text{C}$ pri intenzite osvetlenia $320 - 100\text{ }\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Po uplynutí dvoch týždňov bola kultivácia ukončená a bol stanovený nárast či pokles množstva biomasy.



Obrázok 17: Schéma kultivácie riasy *Coccomyxa* na skríženom gradiente

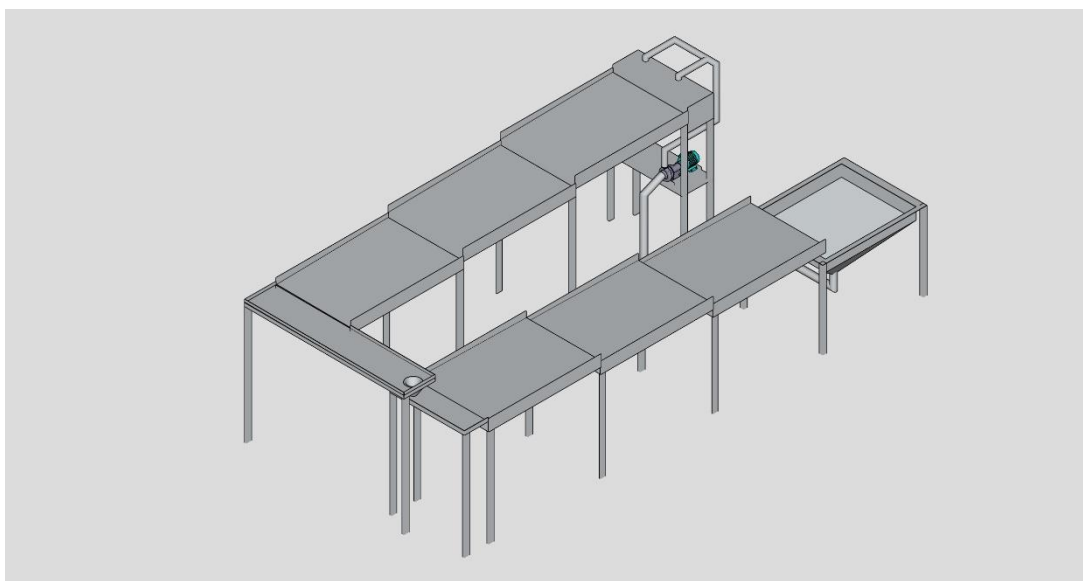
U *Chlorelly*, kmeňa C1A, bol sledovaný heterotrofný aj mixotrofný rast. 2 ml inokula zaočkovaného z agaru do 100 ml heterotrofného chlorellového média, rastúceho pri laboratórnej teplote a prirodzenom osvetlení po dobu 5 dní, o absorbancii 14,82 boli zriedené s 38 ml rovnakého média a vzniknutá suspenzia bola rozliata do 24 sterilných suspenzných 250 ml plastových fľašiek s filtrom. Kultivácia prebiehala v rozmedzí teplôt $33,5\text{ }^{\circ}\text{C} - 19\text{ }^{\circ}\text{C}$ a pri intenzite svetla 320 a $100\text{ }\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Na heterotrofnú kultiváciu nevlývalo žiadne svetlo ($0\text{ }\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Po uplynutí 7 dní bola kultivácia ukončená a bola zmeraná zmena množstva suchej biomasy.



Obrázok 18: Schéma kultivácie Chlorelly C1A na skríženom gradiente

3.3.4. Kultivácia na kaskádovej plošine

Na kaskádovú plošinu bolo aplikovaných 150 l inokula mikroriasy *Dictyosphaerium chlorelloides* o absorbancii $A_{750} = 5,8$, zriedených so 100 l vody. Po celú dobu kultivácie mala riasa zabezpečený prísun CO_2 a vzhľadom na vonkajšie umiestnenie plošiny a obdobie, kedy kultivácia prebiehala (október – december), sa teplota vzduchu počas dňa pohybovala v rozmedzí $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ – $6\text{ }^{\circ}\text{C}$. Kultúra mala prístup len k prirodzenému slnečnému osvetleniu. Meranie zmien v množstve suchej biomasy bolo vykonávané v pravidelných intervaloch, dvakrát týždenne, meraním sušiny a absorbancie po dobu 5 týždňov. Po uplynutí tejto doby musela byť kultivácia predčasne ukončená kvôli nízkym nočným teplotám, ktoré spôsobovali zamrzanie suspenzie.



Obrázok 19: 3D model kaskádovej plošiny pripravený v programe SketchUp



Obrázok 20: Fotka kaskádovej kultivačnej plošiny

3.3.5. Stanovenie biomasy

Pri stanovovaní biomasy z heterotrofnej a fotoautotrofnej kultivácie, kapitola 3.3.1 a 3.3.2, bol zvolený postup nasledovný: do predom zvážených sklenených skúmaviek bolo odoberatých 5 ml kultúry. Biomasa bola od média oddelená v centrifúge po dobu 4 minút pri maximálnej rýchlosti 3 000 rpm, čo predstavovalo odstredivé zrýchlenie $0,86 \cdot 10^3$ g. Médium bolo zliate a biomasa sa nechala usušiť v sušiarňi po dobu 20 hodín. Po vyschnutí boli skúmavky s biomasou umiestnené do exikátoru a po vysušení opäť zvážené.

Pri meraní biomasy zo skríženého gradientu bol postup obdobný ako v predchádzajúcom odseku až na odber suspenzie, ktorý činil 10 ml a zvolenú maximálnu rýchlosť otáčok, ktorá bola 2 500 rpm (odstredivé zrýchlenie asi $0,59 \cdot 10^3$ g).

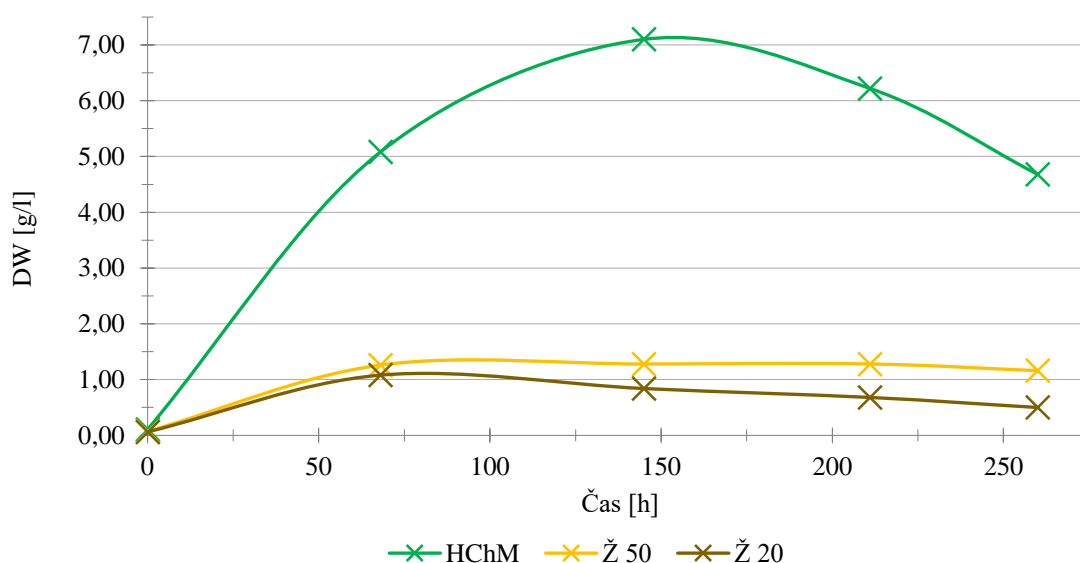
Zo suspenzie kultivovanej na plošine bolo v pravidelných intervaloch odoberatých 10 ml kultúry. Tá bola stočená v centrifúge po dobu 5 minút pri rýchlosti otáčok 5 000 rpm ($\approx 2,38 \cdot 10^3$ g). Až na tieto rozdiely bol postup rovnaký ako v predchádzajúcich prípadoch.

4. VÝSLEDKY A DISKUSIA

Namerané dáta boli spracované v programe Excel a prevedené do dvoch typov grafov. Grafy v kapitolách 4.1, 4.2, 4.3 a 4.5 vyjadrujú závislosť nárastu suchej biomasy (DW) v jednotkách g/l na čas vyjadrenom v hodinách. Grafy v kapitole 4.4 ukazujú rozdiely v konečnom náraste suchej biomasy (DW) v jednotkách g/l v závislosti na teplote (T) v °C a intenzite svetla (I) v jednotkách $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Boli porovnávané účinky rôznych médií: heterotrofné chlorelové médium (HChM), autotrofné chlorelové médium (AChM), 50krát zriedený a 20 krát zriedený žízalový čaj (Ž 50 a Ž 20) v autotrofnom a heterotrofnom prevedení.

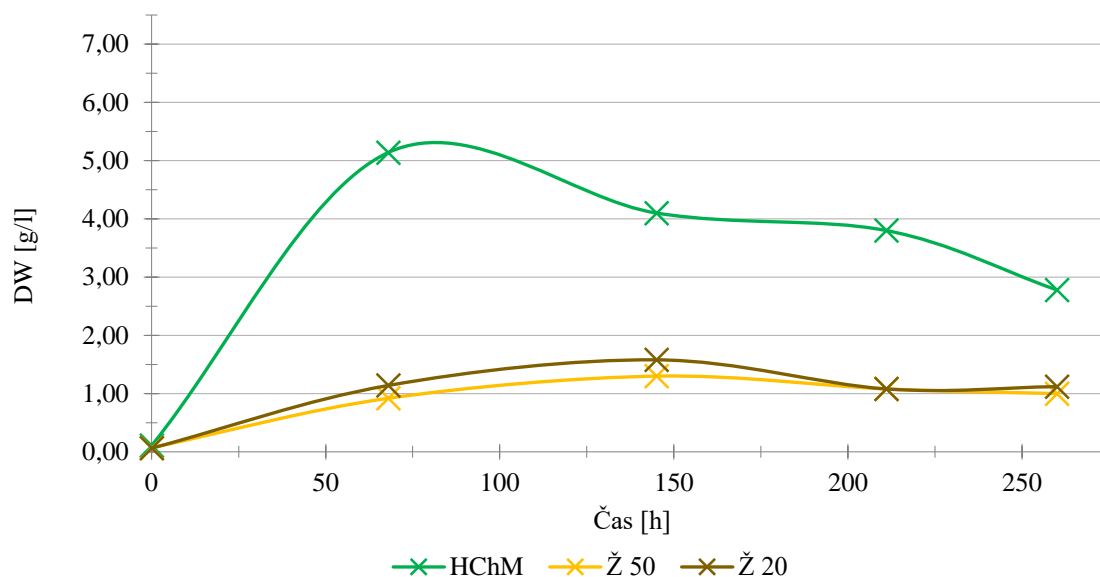
4.1. Heterotrofná kultivácia

Heterotrofná kultivácia bola aplikovaná na 3 kmene riasy, H14, C1A a G11. Použité boli 3 druhy médií, heterotrofné chlorelové médium (HChM) a 20krát (Ž 20) a 50krát (Ž 50) zriedený žízalový čaj. Všetky média obsahovali 20 g/l glukózy. V pravidelných intervaloch bola po dobu 11 dní meraná sušina gravimetricky. Ako prvé sú uvedené grafy zamerané na porovnanie rastu jedného kmeňa v rôznych médiách (Graf 1, Graf 2 a Graf 3). Dáta boli namerané s presnosťou $\pm 0,08$ g/l.



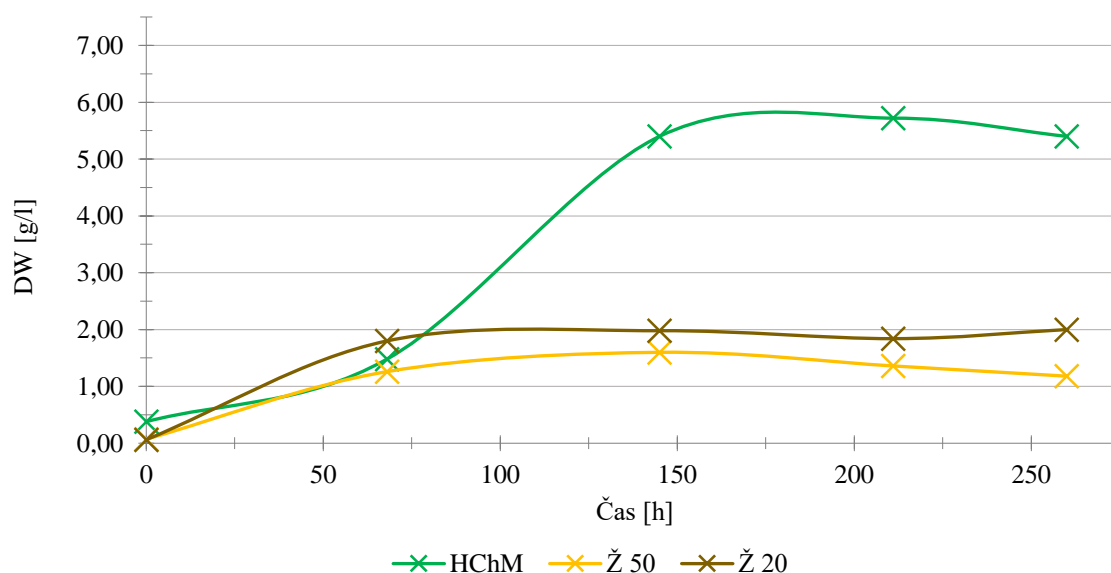
Graf 1: Záznam zmeny biomasy v čase u kmeňa H14

Z dát získaných v priebehu kultivácie, zobrazených do Graf 1, možno jednoznačne vyčítať, že kultivácia v heterotrofnom chlorellovom médiu (HChM), bola výrazne efektívnejšia. Maximum 7,10 g/l, získané na šiesty deň, významne prevyšuje kultúru v zriedenej žízalici, ktoré síce dosiahli svoje maximum na tretí deň, konkrétne 1,08 g/l u 20krát (Ž 20) a 1,28 g/l u 50krát zriedeného roztoku (Ž 50), ale hodnoty sušiny sú mnohonásobne nižšie ako pri použití klasického média.



Graf 2: Záznam zmeny biomasy v čase u kmeňa C1A

Graf 2 zobrazuje kultiváciu chlorelly, kmeň C1A. Aj tu, podobne ako v predchádzajúcom prípade, bolo maximum sušiny zaznamenané pri použití heterotrofného chlorellového média. Riasa dosiahla pík o hodnote 5,14 g/l v priebehu troch dní. V žízalici bolo maximum zaznamenané na šiesty deň, jeho hodnoty však boli opäť výrazne nižšie. 1,58 g/l v dvadsaťkrát zriedenom a 1,30 g/l v päťdesiatkrát zriedenom floriu.

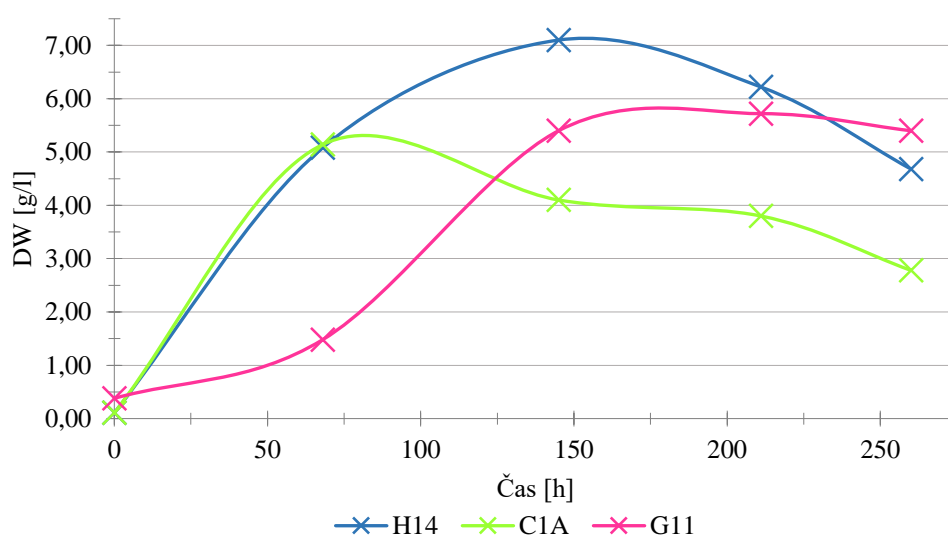


Graf 3: Záznam zmeny biomasy v čase u kmeňa G11

V Graf 3 možno pozorovať rovnaký jav ako v prvých dvoch prípadoch. Riasa dosiahla maximum sušiny (približne 5,9 g/l) v heterotrofnom chlorellovom médiu medzi šiestym

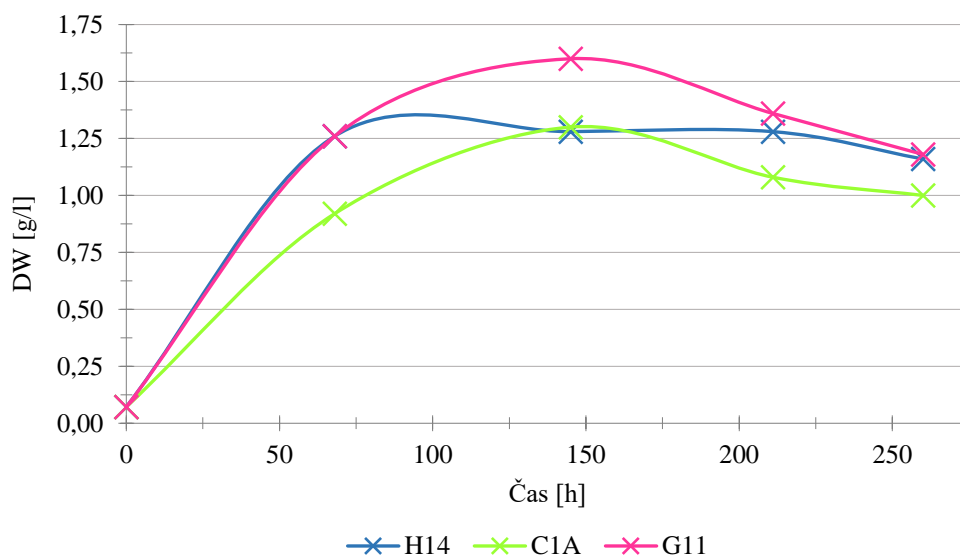
a deviatym dňom. V zriedených roztokoch žížalice bol nárast opäť nízky. Pri 20krát zriedenom roztoku to bolo 1,98 g/l a pri 50krát zriedenom 1,60 g/l.

Ako druhá nasleduje sada grafov porovnávajúcich zmenu suchej biomasy v čase u rôznych rias v rovnakom médiu (Graf 4, Graf 5 a Graf 6).

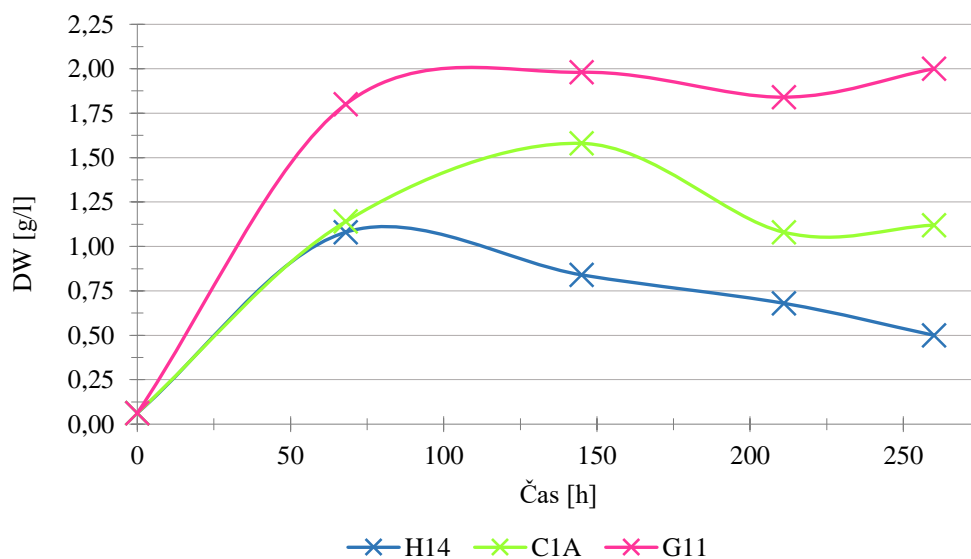


Graf 4: Porovnanie vplyvu heterotrofného chlorellového média na rôzne kmene rias

Vo všetkých troch prípadoch bol rast v heterotrofnom chlorellovom médiu s koncentráciou glukózy 20 g/l výrazne efektívnejší ako v oboch zriedených roztokoch Floria. Ako môžeme vidieť v Graf 4, najviac sa darilo kmeňu H14, ktorý dosiahol maximum sušiny, 7,10 g/l, na šiesty deň.



Graf 5: Porovnanie vplyvu 50krát zriedeného Floria, použitého ako médium, na rôzne kmene rias



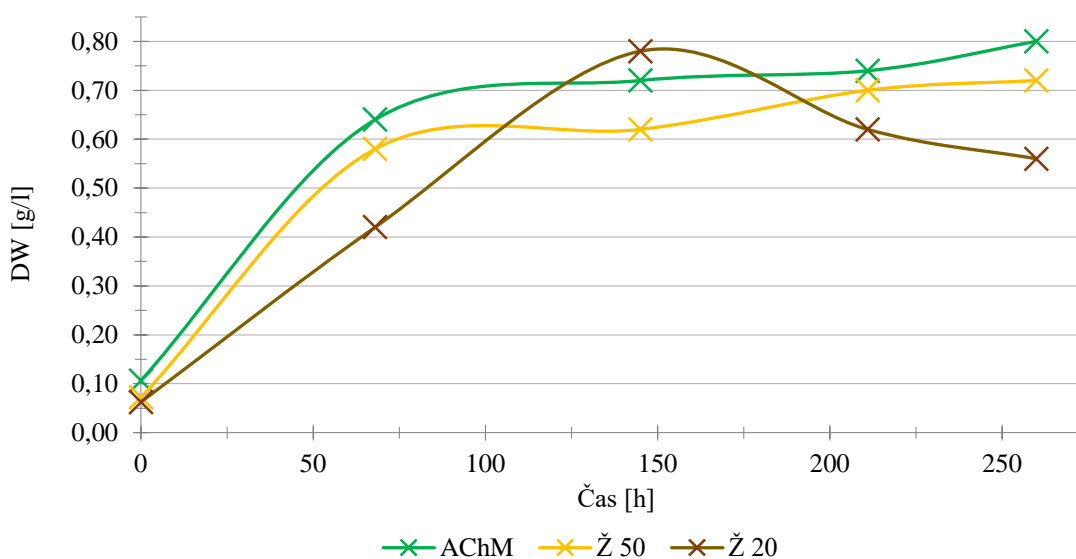
Graf 6: Porovnanie vplyvu 20krát zriedeného Floria, použitého ako médium, na rôzne kmene rias

Pri použití zriedeného roztoku Floria ako živného média, vid' Graf 5 a Graf 6, nenastali významné rozdiely v raste kultúr a ani v jednom prípade nepresiahla koncentrácia sušiny 2 g/l. Ukázalo sa, že z vybraných kmeňov bolo médium najvhodnejšie pre kultúru G11 a to v oboch prípadoch riedenia. Pri dvadsaťkrát riedenom roztoku dosiahla maximum 1,98 g/l suchej biomasy. Naopak v tom istom roztoku sa najmenej darilo rias H14, ktorá na tretí deň dosiahla

pík 1,08 g/l. Zastavenie rastu mohlo byť spôsobené znečistením neznámym kontaminantom, ktoré bolo pozorované po treťom dni kultivácie v tejto kultúre.

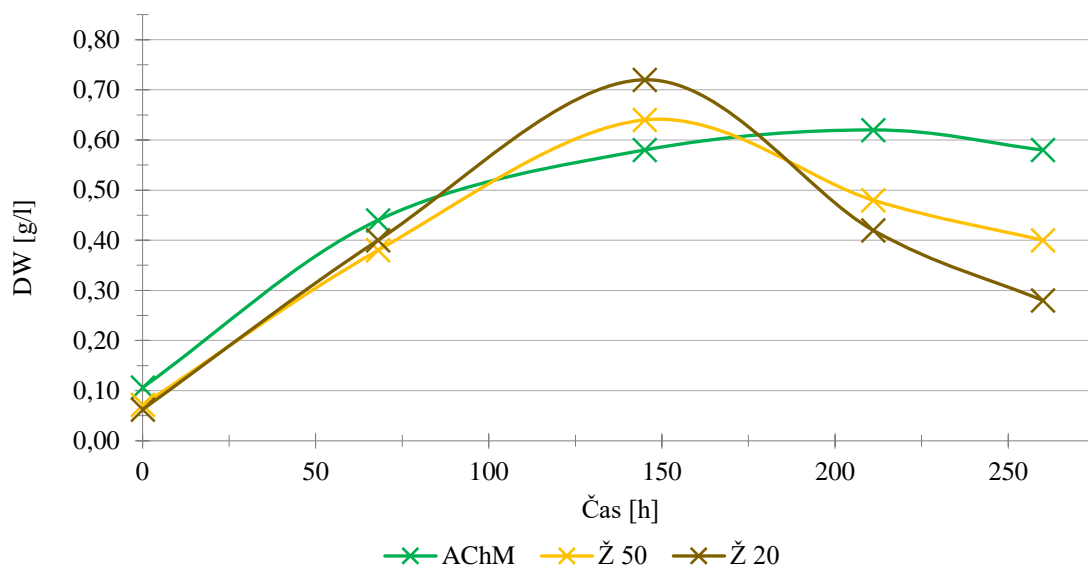
4.2. Autotrofná kultivácia

Autotrofná kultivácia prebiehala rovnako ako heterotrofná, po dobu 11 dní a boli v nej využité rovnaké média ale bez prídavku glukózy. Spracovanie dát bolo zhodné s experimentom v kapitole 3.2.1. Dáta boli namerané so smerodajnou odchýlkou $\pm 0,14$ g/l pre autotrofné médium. Pri použití Floria bola odchýlka nižšia, $\pm 0,08$ g/l.



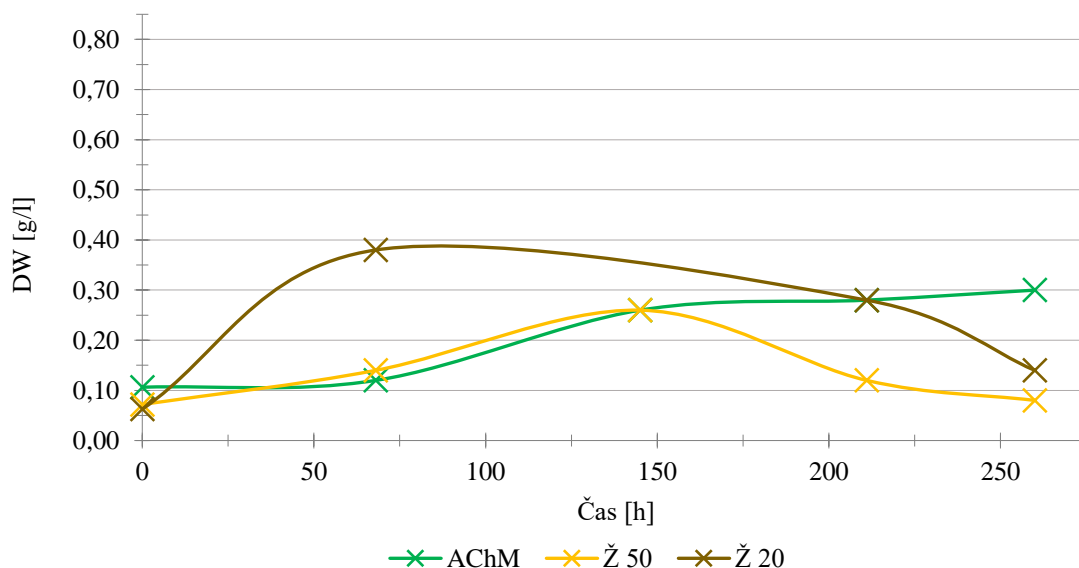
Graf 7: Záznam zmeny biomasy v čase u kmeňa H14

Z Graf 7, ktorý charakterizuje rast kmeňa H14, možno vyčítať, že najvyššiu koncentráciu v najkratšom čase dosahovala riasa pri použití 20krát zriedenej žížalice (Ž 20) a to na šiesty deň, konkrétne 0,78 g/l. Avšak zatiaľ čo sa rast v tomto médiu zastavil hneď po dosiahnutí maxima, biomasa v klasickom chlorellovom médiu (AChM) aj v 50krát zriedenej žížalici sa zvyšovala aj v deň ukončenia experimentu. Maximum dosiahnuté v klasickom médiu dosiahlo hodnoty 0,80 g/l na 11 deň. Na 11 deň dosahovala maximum aj riasa v 50 krát zriedenom médiu, 0,72 g/l.



Graf 8: Záznam zmeny biomasy v čase u kmeňa 255

Kmeňu 255, vid' Graf 8, sa najmenej darilo v chlorellovom médiu, v ktorom dosiahla síce obdobné maximum ako v 50krát zriedenom Floriu, ale až o tri dni neskôr. Naopak najvyššiu sušinu dosahovala pri kultivácii v 20krát zriedenom Floriu, konkrétne 0,72 g/l, v šiesty deň kultivácie.

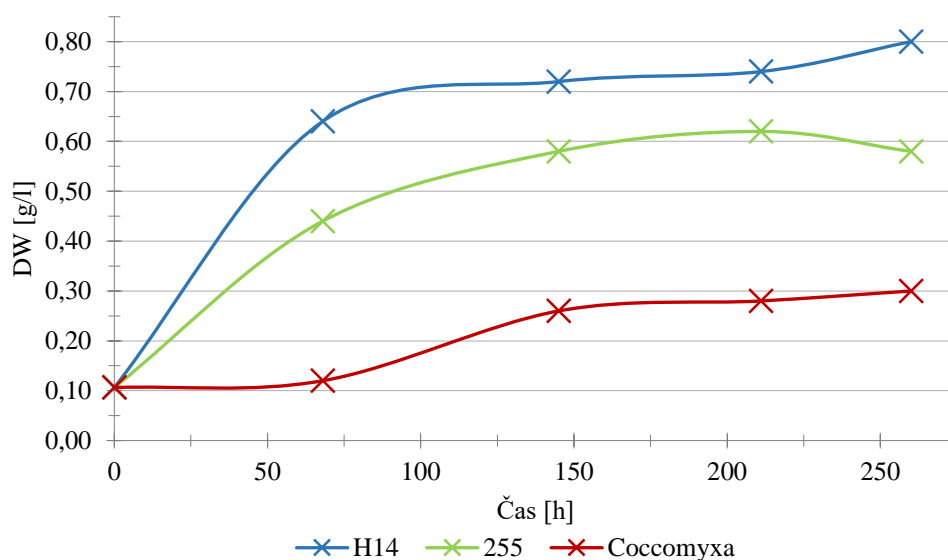


Graf 9: Záznam zmeny biomasy v čase u kmeňa *Coccomyxa*

U riasy *Coccomyxa*, ktorej priebeh kultiváciu odzrkadľuje Graf 9, bol pozorovaný vo všetkých prípadoch veľmi nízky nárast suchej biomasy. Vzhľadom na to, že kultúra bola

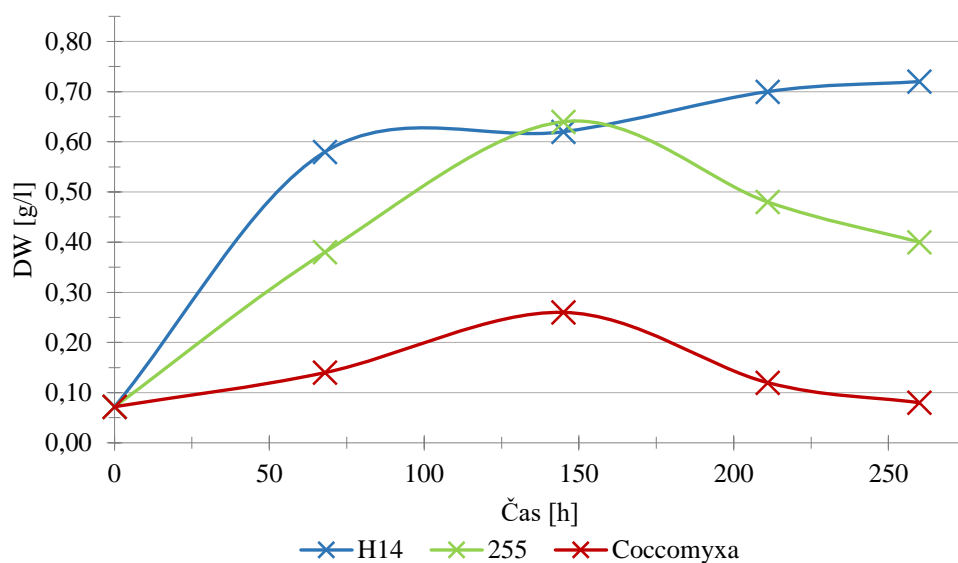
kontrolovaná pod mikroskopom a nedošlo k nálezu kontaminácie, príčina tohto javu nie je úplne jasná. Maximum 0,38 g/l bolo namerané na tretí deň v 20krát zriedenom médiu.

Tak ako v kapitole 4.1, aj tu nasledujú grafy porovnávajúce vplyv rovnakého média na rozličné použité kmene. Vid' Graf 10, Graf 11 a Graf 12.



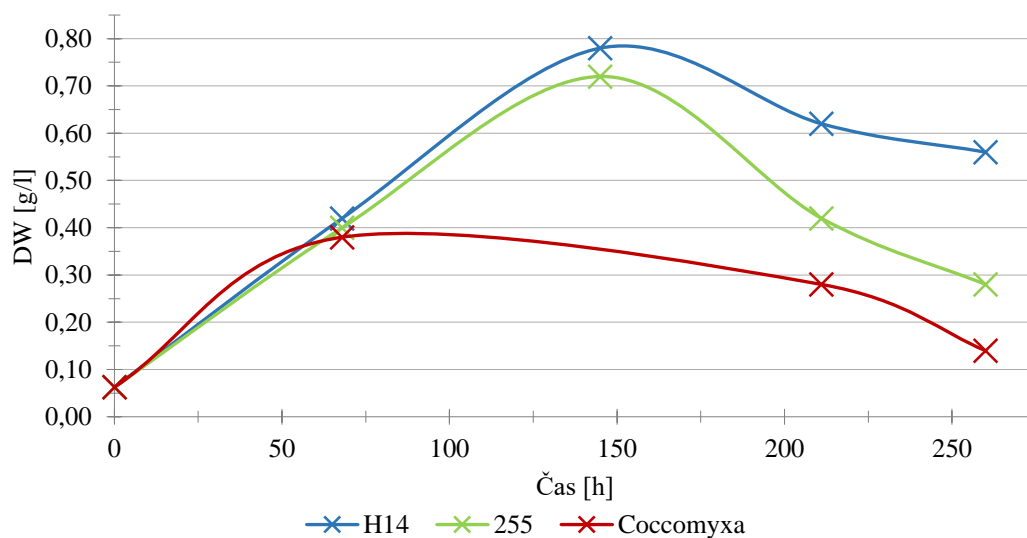
Graf 10: Porovnanie vplyvu heterotrofného chlorellového média na rôzne kmene rias

Graf 10 zobrazuje priebeh autotrofnej kultivácie v chlorellovom médiu, kedy bol rast všetkých kultúr v porovnaní s ostatnými použitými médiami najnižší. Kmeň H14 zaznamenal najprudší nárast od počiatku kultivácie a vykazoval tendencie k zvýšeniu biomasy aj v čase, kedy bol experiment ukončený. Dosiahol koncentráciu sušiny 0,80 g/l. Trochu nižší pík dosiahla riasa 255 na 9. deň, konkrétne 0,62 g/l.



Graf 11: Porovnanie vplyvu 50krát zriedeného Floria, použitého ako médium, na rôzne kmene rias

V 50krát zriedenom médiu prípravku Florium možno pozorovať maximálny nárast kmeňa 255 na šiesty deň, kedy dosiahol hodnotu 0,64 g/l. H14 ako v predchádzajúcom prípade vykazovala známky rastu aj v posledný deň s maximom 0,72 g/l. Nárast biomasy v čase možno vidieť v Graf 11.

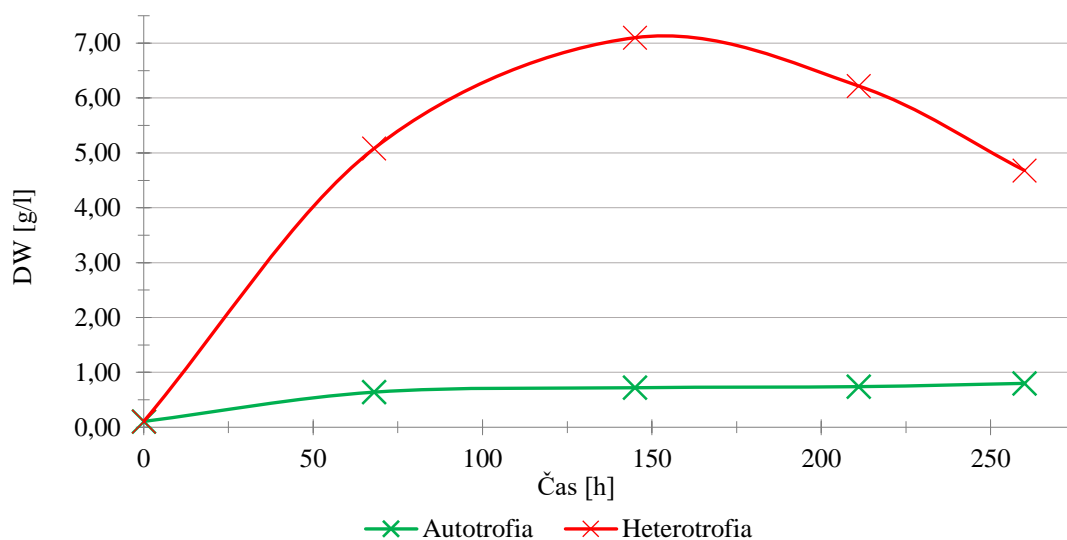


Graf 12: Porovnanie vplyvu 20krát zriedeného Floria, použitého ako médium, na rôzne kmene rias

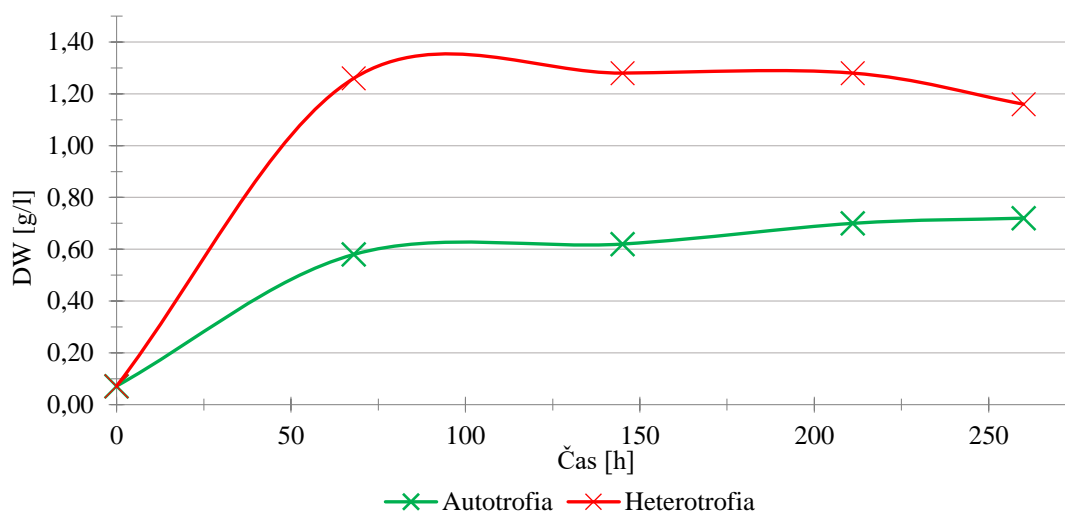
V treťom prípade (viď Graf 12) bol opäť zaznamenaný najvyšší rast u kmeňa H14, bol však len veľmi málo odlišný od kmeňa 255. Oba dosiahli maximá na 6. deň experimentu. H14 0,78 g/l a 255 0,72 g/l suchej biomasy.

4.3. Porovnanie heterotrofnej a autotrofnej kultivácie

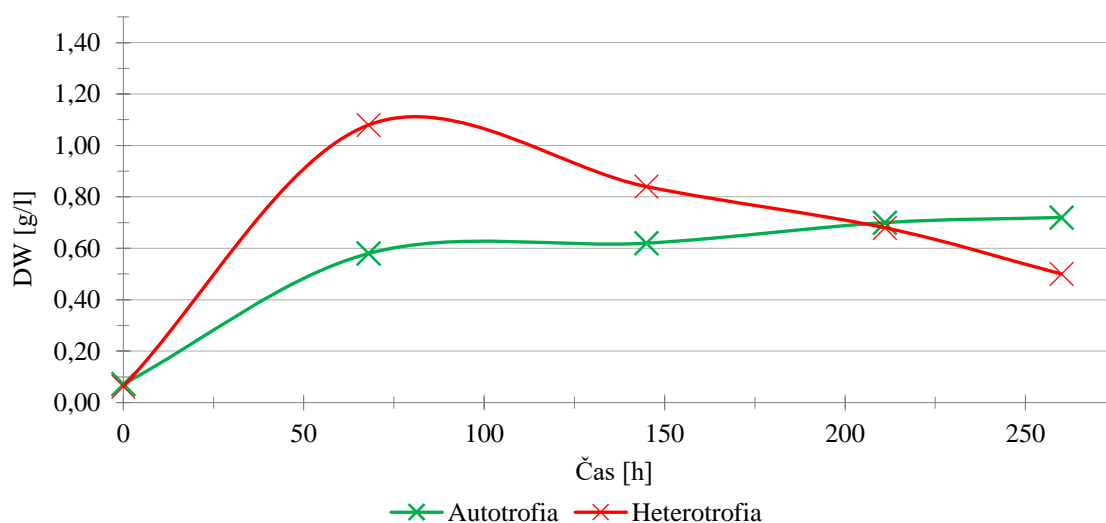
V experimentálnej časti bol použitý jeden kmeň, H14, na ktorom boli otestované oba typy kultivácie, heterotrofná aj autotrofná. Použité bolo rovnaké inokulum aj rovnaký pomer média a inokula a obe kultivácie prebehli pri rovnakej teplote. Pre lepšie sledovanie rozdielov v raste sú priložené grafy, Graf 13 - Graf 15.



Graf 13: Zmena biomasy v čase u heterotrofne a autotrofne rastúceho kmeňa v chlorellovom médiu



Graf 14: Zmena biomasy v čase u heterotrofne a autotrofne rastúceho kmeňa H14 v 50krát zriedenom Floriu



Graf 15: Zmena biomasy v čase u heterotrofne a autotrofne rastúceho kmeňa H14 v 20krát zriedenom Floriu

Z grafov jednoznačne vyplýva fakt, že heterotrofná kultivácia je pre tento kmeň mnohonásobne efektívnejšia v porovnaní s fotoautotrofnou kultiváciou. V Graf 13, ktorý zrovnáva oba typy kultivácie pri použití klasického chlorellového média s a bez prídavku glukózy je rozdiel azda najpozorovateľnejší. Zatiaľ čo riasa čerpajúca živiny z glukózy presiahla hodnotu 7 g/l suchej biomasy, autotrofne žijúca vzorka nepresiahla ani len 1 g/l sušiny. Pri použití Floria neboli rozdiely až také drastické. V päťdesiatkrát zriedenom roztoku dosiahla heterotrofná kultúra sušinu 1,3 g/l, autotrofná 0,7 g/l. V poslednom experimente môžeme vidieť, že heterotrofná kultúra dosiahla maximum hodnoty suchej biomasy na tretí deň

(1,08 g/l), potom nastal pokles v raste. Autotrofná kultúra zaznamenávala rast počas celej doby kultivácie, avšak ani na posledný deň nedosiahla hodnoty sušiny vyššie ako heterotrofná vzorka.

4.4. Kultivácia na skríženom gradiente

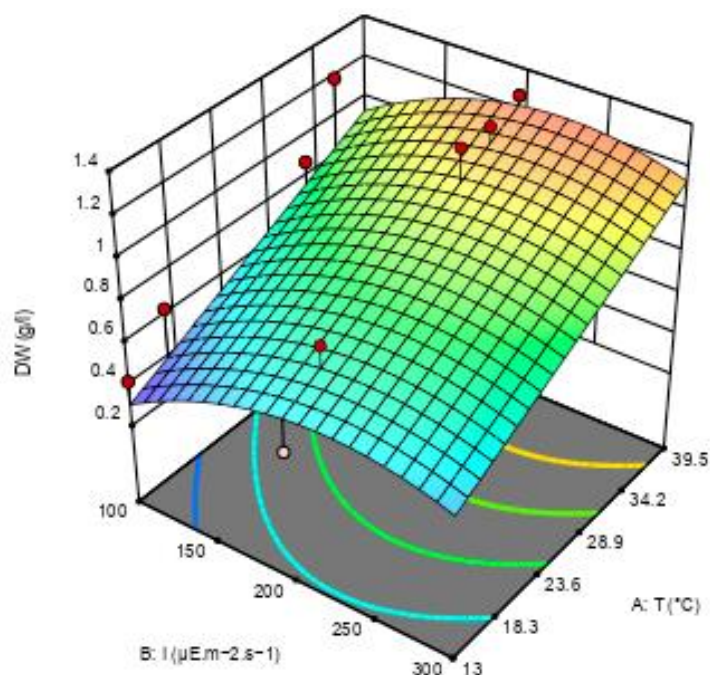
4.4.1. Kultivácia kmeňa *Coccomyxa*

Pri kultivácii riasy *Coccomyxa* na skríženom gradiente bolo použité rozloženie 3x8, teda také, pri ktorom bolo použitých 8 rôznych teplôt v rozmedzí 13-39,5 °C a tri rôzne intenzity osvetlenia, 320, 200 a 100 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Pretože kultúra rástla veľmi pomaly, kultivácia prebiehala 14 dní, aby rozdiely v raste a správaní rastliny boli čo najviditeľnejšie.

Tabuľka 8: Kultivácia na skríženom gradiente, *Coccomyxa*

Zn.	Č.	T [°C]	I [$\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$]	DW [g/l]	
				t_0	Δt_{329}
1A	1	39,5	320	0,07	0,89
2A	2	36,0	320	0,07	1,07
3A	3	32,5	320	0,07	1,18
4A	4	28,5	320	0,07	0,75
5A	5	24,5	320	0,07	0,63
6A	6	20,5	320	0,07	0,65
7A	7	17,0	320	0,07	0,56
8A	8	13,0	320	0,07	0,39
1B	9	39,5	200	0,07	1,27
2B	10	36,0	200	0,07	1,22
3B	11	32,5	200	0,07	1,22
4B	12	28,5	200	0,07	0,93
5B	13	24,5	200	0,07	0,74
6B	14	20,5	200	0,07	0,69
7B	15	17,0	200	0,07	0,79
8B	16	13,0	200	0,07	0,43
1C	17	39,5	100	0,07	0,57
2C	18	36,0	100	0,07	1,19
3C	19	32,5	100	0,07	0,88
4C	20	28,5	100	0,07	0,50
5C	21	24,5	100	0,07	0,37
6C	22	20,5	100	0,07	0,44
7C	23	17,0	100	0,07	0,64
8C	24	13,0	100	0,07	0,42

Z uvedených údajov (Tabuľka 8) vyplýva, že najvyšší nárast (1,27 g/l) dosiahla kultúra pri strednom osvetlení a najvyššej teplote, najnižší (0,37 g/l) bol zaznamenaný u vzorky pri strednej teplote 24,5 °C a najmenšom osvetlení 100 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Ak sa zameriame na vplyv svetla, je jednoznačné, že riasam sa najlepšie darilo pri strednom osvetlení, pričom množstvo konečnej biomasy klesalo so znižujúcou sa teplotou. Priemerne najmenšiu biomasu dosiahli vzorky rastúce pri najmenšom osvetlení. Pri použití najvyššieho osvetlenia pôsobili vysoké teploty inhibične, čo si môžeme všimnúť z nárastu množstva biomasy s klesajúcou teplotou až do dosiahnutia teploty 32,5 °C, kedy dosiahla kultúra v rámci radu A najvyššiu hodnotu. Ďalej nasleduje trend klesania sušiny s teplotou.



Graf 16: Závislosť rastu biomasy v závislosti od intenzity svetla a teploty

Popísané výsledky je možné interpretovať aj z trojrozmerného Graf 16, znázorňujúceho závislosť rastu biomasy na oboch faktoroch - teploty a intenzity svetla. Tento graf bol vytvorený z experimentálnych dát pomocou softwaru Expert Design 8. Z grafu jasne vyplýva trend klesania biomasy s klesajúcou teplotou a je možné sledovať pokles aj pri odchýlení sa od úrovne strednej intenzity svetla danej hodnotou $200 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

4.4.2. Kultivácia kmeňa C1A

Rozloženie pri kultivácii tohto kmeňa bolo obdobné ako v predošlom prípade. Jediným rozdielom bolo použité rozmedzie teplôt, $33,5-19^\circ\text{C}$. Ďalším odlišným aspektom bolo použitie rôznych typov kultivácií, konkrétne mixotrofia a heterotrofia. Kultivácia prebiehala 7 dní.

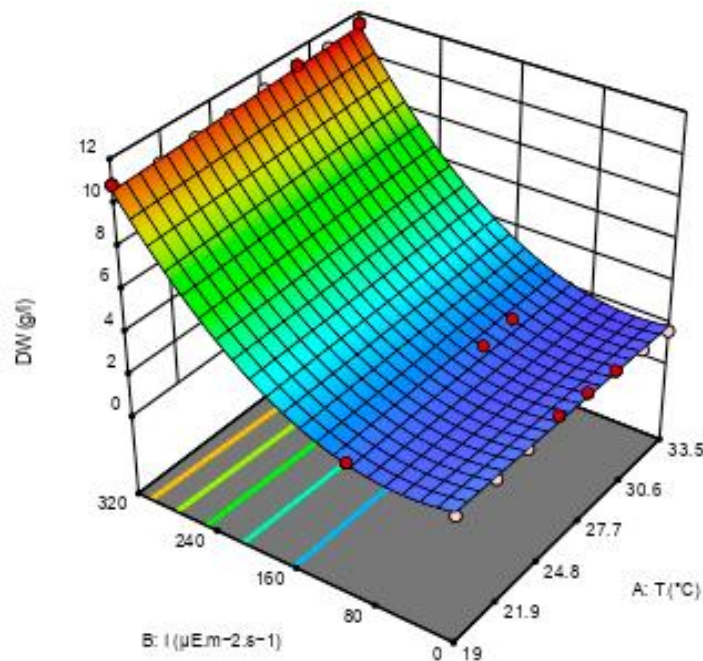
Tabuľka 9: Kultivácia na skríženom gradiente, kmeň C1A

Zn.	Č.	T [°C]	I [$\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$]	DW [g/l]		Typ kultivácie
				t_0	Δt_{166}	
1A	1	33,5	320	0,28	11,46	MIXOTROFIA
2A	2	31,5	320	0,28	11,16	
3A	3	29,5	320	0,28	11,23	
4A	4	27,5	320	0,28	11,02	
5A	5	25,5	320	0,28	10,76	
6A	6	23,5	320	0,28	10,71	
7A	7	21,5	320	0,28	10,56	
8A	8	19	320	0,28	10,86	
1B	9	33,5	0	0,28	1,64	HETEROTROFIA
2B	10	31,5	0	0,28	1,90	
3B	11	29,5	0	0,28	2,11	
4B	12	27,5	0	0,28	2,29	
5B	13	25,5	0	0,28	2,48	
6B	14	23,5	0	0,28	2,20	
7B	15	21,5	0	0,28	2,13	
8B	16	19	0	0,28	2,17	
1C	17	33,5	100	0,28	1,96	MIXOTROFIA SO SLABÝM OSVETLENÍM
2C	18	31,5	100	0,28	2,17	
3C	19	29,5	100	0,28	2,72	
4C	20	27,5	100	0,28	2,59	
5C	21	25,5	100	0,28	2,30	
6C	22	23,5	100	0,28	2,20	
7C	23	21,5	100	0,28	2,13	
8C	24	19	100	0,28	2,43	

Z dát uvedených v Tabuľka 9 vyplýva, že mixotrofia pri intenzívnejšom osvetlení bola oproti heterotrofii a mixotrofii v slabom osvetlení omnoho efektívnejšia. Tie dosahovali porovnateľné hodnoty sušiny a nepresiahli hranicu 3 g/l.

U mixotrofie pri intenzite svetla $320 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ dosiahla najvyššiu sušinu kultúra rastúca pri najvyššej použitej teplote. Bolo to až 11,46 g/l, čo predstavuje približne 40násobný nárast sušiny za sedem dní. S nižšími teplotami sa množstvo biomasy síce znižovalo, ale v porovnaní s inými kultiváciami na skríženom gradiente predstavovala práve táto najefektívnejší spôsob kultivácie za účelom získania čo najvyššieho množstva suchej biomasy a jej hodnoty sa držali nad 10 g/l.

U heterotrofie mala najvyššiu účinnosť stredná teplota 25,5 °C. Smerom k nižším aj k vyšším teplotám biomasa klesala. Mixotrofia so slabým osvetlením vykazovala rovnaký jav ale pokles nastával od teploty 29,5 °C.

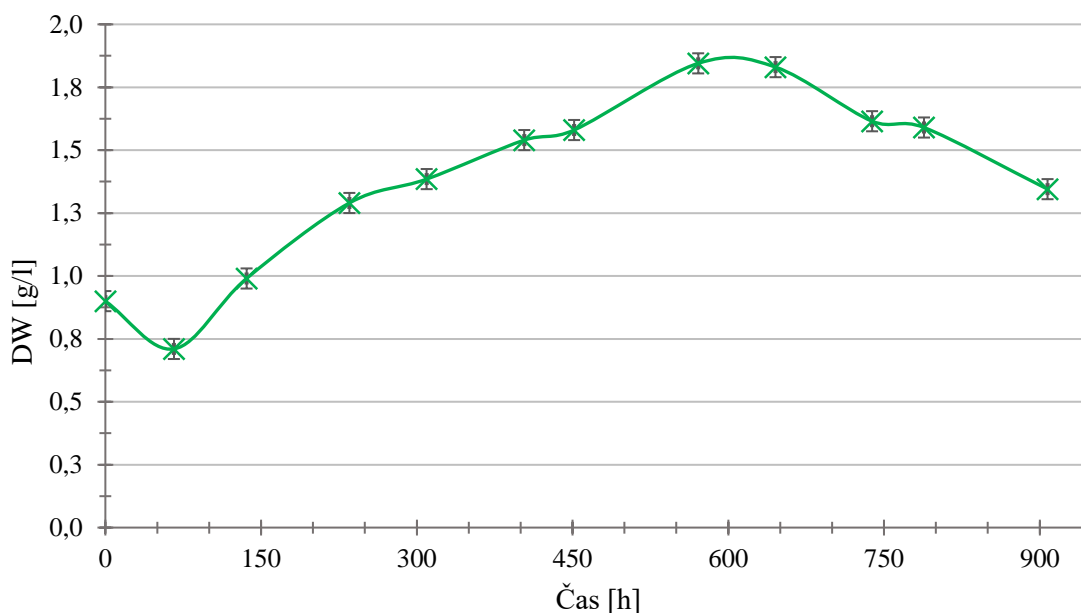


Graf 17: Závislosť rastu biomasy v závislosti od intenzity svetla a teploty

Z nameraných dát bol aj v tomto prípade spracovaný trojrozmerný graf (viď Graf 17) pomocou softwaru Expert Design 8 zobrazujúci vplyv teploty a intenzity svetla na rast sušiny. V grafe možno jasne odčítať sklon riasy rásť hlavne pri vyšších intenzitách osvetlenia. Vplyv teploty nie je až taký výrazný a možno ho zaznamenať až pri použití vysokej intenzity osvetlenia, kedy mierne stúpa koncentrácia biomasy so zvyšujúcou sa teplotou.

4.5. Kultivácia na kaskádovej plošine

Pre fotoautotrofnú kultiváciu na plošine bola zvolená mikroriasa *Dictyosphaerium chlorelloides*, a to z technických dôvodov – plošinový fotobioreaktor bol k dispozícii po ukončení bežnej kultivačnej sezóny v novembri, za klimatických posmienok, pri ktorých by viac teplomilná chlorella už nerástla. Bola preto zvolená technologicky zaujímavá mikroriasa *D. chlorelloides* kmeň CCALE 330, známa vysokou produkciou žiadaných exopolysacharidov, ktoré môžu mať využitie v potravinárskom, kozmetickom a farmaceutickom priemysle. Jej rast bol zaznamenávaný meraním koncentrácie sušiny v pravidelných časových intervaloch. Priebeh kultivácie a zmeny koncentrácie suchej biomasy možno pozorovať v Graf 18, vyjadrujúcom závislosť zmeny sušiny v jednotkách g/l na čase v hodinách.



Graf 18: Záznam zmeny biomasy v čase u riasy *Dictyosphaerium chlorelloides*

Graf 18 charakterizujúci zmenu suchej biomasy v čase vznikol z priemeru koncentrácií dvoch vzoriek odobratých v rovnakom čase za rovnakých podmienok. Hodnoty koncentrácie sušiny boli stanovené s presnosťou $\pm 0,04$ g/l.

Z grafu možno vyčítať počiatočný pokles rastu riasy. Po adaptácii na nové podmienky bol zaznamenaný nárast biomasy až do 24. dňa, kedy nastala krátka stacionárna fáza, trvajúca približne 3 dni, a po nej nasledoval už len pokles rastu. Hodnota maximálnej koncentrácie biomasy bola 1,85 g/l, pričom na počiatku mala kultúra koncentráciu sušiny 0,9 g/l. Z toho vyplýva, že kultúra po dobu 24 dní narástla približne dvojnásobne.

Vzhľadom na to, že kultúra bola pravidelne sledovaná pod mikroskopom a závažná kontaminácia bola vylúčená, jednalo sa pravdepodobne o inhibíciu teplotou a nedostatkom slnečného žiarenia. Podľa záznamov ČHMU z obdobia november, mesiaca tvoriaceho najvýznamnejšie časové obdobie kultivácie, sa priemerná mesačná teplota vzduchu pohybovala okolo 5°C a počet jasných dní sa blížil k nule. Ďalej bolo zaznamenaných 8 mrazových dní. Tieto dáta boli získané na meteorologickej stanici Brno-Tuřany a slúžia len pre ilustráciu podnebných situácií v konkrétnom období. Plošinový bioreaktor bol totiž umiestnený v skleníku, v ktorom bola teplota zvyčajne vyššia oproti vonkajšej. Počas odberu bola preto vždy zaznamenaná aj teplota kultúry. Prehľad teplôt je uvedený v Tabuľka 10 [44].

Tabuľka 10: Prehľad stanovenej sušiny a teploty suspenzie v čase odberu vzorky

Dátum	Čas	Δt [h]	Sušina [g/l]	T [°C]
28.10.17	17:00	0	0,90	13,4
31.10.17	11:00	66	0,71	14,1
03.11.17	9:00	136	0,99	13,7
07.11.17	12:00	235	1,29	20,0
10.11.17	15:30	310	1,39	12,5
14.11.17	13:00	404	1,54	14,0
16.11.17	13:00	452	1,58	9,9
21.11.17	12:30	571	1,85	10,4
24.11.17	15:00	646	1,83	9,5
28.11.17	12:00	739	1,62	12,3
30.11.17	15:00	789	1,59	6,1
05.12.17	13:00	908	1,34	8,4

Môžeme si všimnúť, že keďže sa teplota držala nad 10 °C, kultúra síce pomaly, ale stabilne rástla. Po náhlom poklese teplôt pod 10 °C sa začal rast mikroriasy spomaľovať až nakoniec klesal. Následne musela byť kultivácia po 38 dňoch ukončená, pretože nízke nočné teploty spôsobovali zamrzenie suspenzie. Týmto experimentom bolo dokázané, že kultivácia *D. chlorelloides* umožňuje mimo iné efektívne využiť plošinový fotoboreaktor za klimatických podmienok nízkych teplôt, kde by napríklad *Arthrospina sp.* či *Chlorella sp.* prakticky nerástli.

5. ZÁVER

Cieľom diplomovej práce bolo získanie teoretických poznatkov o kultivácii mikrorias predovšetkým rodu *Chlorella*, ale aj iných, a následne ich aplikácia za cieľom optimalizovania podmienok kultivácie. Experimentálne bol sledovaný priebeh a rýchlosť rastu šiestich rôznych kmeňov mikrorias v rôznych podmienkach. Výsledky rôznych typov kultivácii boli porovnané.

V prvej časti experimentu bola porovnávaná kultivácia v troch rôznych médiách, v chlorellovom médiu a v roztoku Floria zriedenom dvadsať a päťdesiatkrát. Kultivácia prebiehala na dva spôsoby – heterotrofne, s prídavkom glukózy a bez prístupu svetla, a autotrofne. Autotrofne boli kultivované riasy *Chlorella* H14, 255 a *Coccomyxa*. Heterotrofne *Chlorella* H14, C1A a G11.

U autotrofnej kultivácie sa ukázalo ako najefektívnejšie použitie dvadsaťkrát zriedeného roztoku Floria, a to vo všetkých troch prípadoch. Treba však podotknúť, že rozdiely boli minimálne a pri voľbe média by teda rozhodovali iné faktory, ako napríklad účel kultivácie alebo ekonomická dostupnosť média. Ani pri jednej zo vzoriek nedošlo k presiahnutiu hranice 1 g/l. Maximálny nárast sme sledovali u kmeňa H14 (0,78 g/l). Pri použití inokula o biomase 0,11 g/l tak došlo k sedemnásobnému zvýšeniu biomasy v priebehu 11 dní. Vzhľadom na to, že biomasa chlorelly obsahuje v priemere približne 40% bielkovín, čo je v prepočte 6,4 g dusíka na 100 gramov biomasy a 20krát zriedené Florium obsahovalo 0,05 g dusíka, predstavuje dosiahnuté množstvo biomasy (0,78 g/l) maximum, ktoré je možné pri takomto zastúpení dusíka v médiu dosiahnuť.

Kultivácia heterotrofného typu trvala taktiež 11 dní. Zatiaľ čo pri autotrofii bola kultivácia vo Floriu úspešná a dosahovala porovnateľných kvalít ako tá v chlorellovom médiu, v prípade heterotrofie došlo presne k opačnej situácii. Najvyšších hodnôt dosahovali vzorky v syntetickom heterotrofnom chlorellovom médiu. Ich maximá boli mnohonásobne vyššie a v podstate neporovnateľné so vzorkami rastúcimi v zriedenom roztoku Floria. Pre príklad, najvyššou dosiahnutou sušinou bolo 7,10 g/l u riasy H14, čo predstavuje 65násobný nárast sušiny voči inokulu. Pri použití Floria to bolo 18násobné zvýšenie hodnoty biomasy aj v 50krát aj v 20krát zriedenom prípravku.

Kmeň H14 bol kultivovaný aj heterotrofne aj autotrofne a preto mohlo byť vykonané dôkladné porovnanie vplyvu použitia jedného z uvedených typov na mikroriasy. Vo všetkých prípadoch, teda pri použití chlorellového média a Floria v oboch variantoch mala výrazne navrch kultivácia heterotrofná. Najvyšší rozdiel bol dosiahnutý pri použití heterotrofného a autotrofného chlorellového média, 7,10 g/l oproti 0,74 g/l. Najmenší rozdiel nastal pri použití 20krát zriedeného roztoku Floria. Heterotrofná kultúra dosiahla maximum 1,08 g/l a autotrofná 0,78 g/l.

Hoci by sa na prvý pohľad mohla zdať kultivácia v prípravku Florium v porovnaní so syntetickým chlorellovým médiom menej účinná, treba najprv zvážiť viac faktorov. Z Tabuľka 7, v ktorej je uvedené porovnanie koncentrácií makronutrientov ako je dusík, fosfor a draslík je značné, že v tak zriedenom množstve, v akom bolo Florium použité, je zastúpenie všetkých prvkov nižšie ako v chlorellovom médiu, pričom najvýraznejší rozdiel je v zastúpení, pre riasy veľmi dôležitom, dusíka. Zatiaľ čo v chlorellovom médiu je to 0,428 g/l dusíku, v 20krát

zriedenom Floriu je to približne o 10krát menej. V päťdesiatkrát zriedenom floriu až 25krát menej. Aby sa mohli obe médiá zrovnávať bolo by vhodné použiť nižšie riedenie, asi len dvojnásobné. Ďalším faktorom je možná limitácia niektorým z mikronutrientov. Nakoľko nebola vykonaná žiadna podrobná prvková analýza Floria, nie je možné vylúčiť absenciu niektorého z prvkov dôležitých pre rast mikroriasy. Aj napriek tomu sa Florium ukázalo ako potenciálne vhodný substrát na kultiváciu mikrorias a bolo by potrebné vykonať viac pokusov na zistenie optimálneho riedenia tohto prípravku.

Ďalším bodom praktickej časti bola kultivácia na skríženom gradiente. Ako prvá bola testovaná riasa *Coccomyxa* pri teplotách 39,5-13 °C a intenzite svetla 320-100 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Najvyšší nárast biomasy bol zaznamenaný pri kombinácii najvyššej teploty a stredného osvetlenia (200 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). Celkovo mala na riasu pozitívnejší vplyv vyššia teplota a v prípadoch každého z osvetlení dochádzalo po prekročení 28 °C smerom k nižším teplotám k rapidnému úpadku biomasy. Najefektívnejšie bolo osvetlenie 200 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

U riasy C1A, ktorá bola ďalšou riasou testovanou na skríženom gradiente, boli rozdiely biomasy viditeľné voľným okom už po jednom týždni. V tomto prípade bola skúšaná heterotrofná a mixotrofná kultivácia v rozmedzí teplôt 33,5 až 19 °C. Jej výsledky boli porovnateľné s kultúrou rastúcou autotrofne pri najslabšom osvetlení. Trendom u heterotrofie bolo klesať od strednej teploty, 25,5 °C, kedy dosiahla maximum 2,48 g/l, do oboch strán, teda pokles biomasy nastal aj so zvyšujúcou aj so znižujúcou sa teplotou. Mixotrofná slabo osvetlená kultúra zaznamenala rovnaké tendencie ale stredovou teplotou bola 29,5 °C, s maximálnou sušinou 2,72 g/l. Najlepšie obstála mixotrofná kultivácia osvetlená najintenzívnejším žiarením 320 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Všetky dosahovali sušiny nad 10,5 g/l. Maximum, 11,46 g/l, bolo dosiahnuté pri najvyššej teplote 33,5 °C.

Ako posledný je vedený experiment kultivácie na plošnom bioreaktore v exteriéry. Použitá riasa *Dictyosphaerium chlorelloides* bola kultivovaná po dobu približne jedného mesiaca (907 hodín) v období október až december.. Jednalo sa o autotrofnú kultiváciu, pričom jediným zdrojom svetla bolo slnečné žiarenie. To a ešte hodnoty teplôt v tomto čase malo pravdepodobne za následok veľmi malý nárast kultúry. Riasa totiž dosiahla maximum 1,85 g/l. To znamená, že pri použití inokula o veľkosti biomasy 0,9 g/l došlo za dobu troch týždňov iba k zdvojnásobeniu hodnoty biomasy. Podľa všetkého bol tento jav spôsobený nepriaznivými teplotnými podmienkami a nedostatkom slnečného svetla. I za týchto veľmi nevýhodných klimatických podmienok však došlo k nárastu riasovej biomasy, čo ukazuje, že využitím rias s toleranciou k nižšej teplote je možné predĺžiť kultivačné obdobie priemyselného pestovania na plošine.

6. ZOZNAM POUŽITÝCH ZDROJOV

- [1] SINGH, R.N. a Shaishav SHARMA. Development of suitable photobioreactor for algae production – A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2012, **16**(4), 2347-2353. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2012.01.026>.
- [2] MATA, Teresa M., António A. MARTINS a Nidia S. CAETANO. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. **14**(1), 217-232. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.07.020>.
- [3] Microscopic algae produce half the oxygen we breathe. *ABC* [online]. 26 October 2013 [cit. 2019-02-11]. Dostupné z: <https://www.abc.net.au/radionational/programs/scienceshow/microscopic-algae-produce-half-the-oxygen-we-breathe/5041338>
- [4] LEWIN, Ralph A. a Robert A. ANDERSON. Algae: Protist. *ENCYCLOPEDIA BRITANNICA* [online]. USA LAST UPDATED: Jan 24, 2019 [cit. 2019-02-11]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/algae>
- [5] Chlorella: GENUS OF GREEN ALGAE. *ENCYCLOPEDIA BRITANNICA* [online]. USA [cit. 2019-02-11]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/Chlorella>
- [6] BELASCO, Warren. Algae Burgers for a Hungry World? The Rise and Fall of Chlorella Cuisine. *Technology and Culture*. 1997, **38**(No. 3), 608-634 [cit. 2019-02-11]. DOI: 10.2307/3106856
- [7] Vitamins & Supplements: Chlorella. *WebMD* [online]. 2005 [cit. 2019-02-11]. Dostupné z: <https://www.webmd.com/vitamins/ai/ingredientmono-907/chlorella>
- [8] MOURELLE, M., Carmen GÓMEZ a José LEGIDO. The Potential Use of Marine Microalgae and Cyanobacteria in Cosmetics and Thalassotherapy. *Cosmetics* [online]. 2017, **4**(4) [cit. 2019-02-11]. DOI: 10.3390/cosmetics4040046. ISSN 2079-9284. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2079-9284/4/4/46>
- [9] BAJPAI, Divya a V.K. TYAGI. Biodiesel: Source, Production, Composition, Properties and Its Benefits. *Journal of Oleo Science* [online]. 2006, **55**(10), 487-502 [cit. 2019-02-11]. DOI: 10.5650/jos.55.487. ISSN 1345-8957.
- [10] SCHENK, Peer M., Skye R. THOMAS-HALL, Evan STEPHENS, Ute C. MARX, Jan H. MUSSGUNG, Clemens POSTEN, Olaf KRUSE a Ben HANKAMER. Second Generation Biofuels: High-Efficiency Microalgae for Biodiesel Production. *BioEnergy Research* [online]. 2008, **1**(1), 20-43 [cit. 2019-02-11]. DOI: 10.1007/s12155-008-9008-8. ISSN 1939-1234.
- [11] JANKOVIČOVÁ, K. Problematika produkce řas rodu Chlorella v průtočných bioreaktorech. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 39 s. Vedoucí bakalářské práce doc.Ing.Tomáš Svěrák, CSc.
- [12] CINAR, Ali, Satish J. PARULEKAR, Cenk UNDEY a Gulnur BIROL. *Batch Fermentation: Modeling, Monitoring, and Control*. I. United Kingdom: Taylor & Francis, 2003, 648 pages. ISBN 9780824740344.
- [13] EL-MANSI, E.M.T, C. F. A. BRYCE, Arnold L. DEMAİN a A. R. ALMAN. *Fermentation microbiology and biotechnology*. 3rd ed. Boca Raton, FL: Taylor & Francis/CRC Press, 2012. ISBN 978-1439855799.

- [14] Bacterial Growth Curve. In: *Orbit Biotech™* [online]. [cit. 2019-02-12]. Dostupné z: <https://orbitbiotech.com/bacterial-growth-curve-generation-time-lag-phase-log-phase-exponential-phase-decline-phase/>
- [15] BRUSLIND, Linda. Microbiology: Microbial Growth. *Oregon State University* [online]. Oregon, USA [cit. 2019-02-12]. Dostupné z: <http://library.open.oregonstate.edu/microbiology/chapter/microbial-growth/>
- [16] PEREZ-GARCIA, Octavio, Froylan M.E. ESCALANTE, Luz E. DE-BASHAN a Yoav BASHAN. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Research* [online]. 2011, **45**(1), 11-36 [cit. 2019-02-14]. DOI: 10.1016/j.watres.2010.08.037. ISSN 00431354. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0043135410006019>
- [17] PROKOP, Aleš, Rakesh K. BAJPAI a Mark E. ZAPPI. *Algal Biorefineries*. Volume 2. Springer, 2015. ISBN 978-3-319-20200-6.
- [18] BAGCHI, Debasis, Francis LAU a Dilip K. GHOSH. *Biotechnology in functional foods and nutraceuticals*. Boca Raton: CRC Press, 2010. ISBN 9781420087116.
- [19] SUBHASH, G.Venkata a Meghna RAJVANSHI. Carbon streaming in microalgae: extraction and analysis methods for high value compounds. *Bioresource Technology*. 2017, (Volume 244, Part 2), 1304-1316. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.024>.
- [20] MASOJÍDEK, Jiří, Richard LHOTSKÝ a Ondřej PRÁŠIL. Mikrořasy – solární továrna v jedné buňce. *Algatech* [online]. 2016 [cit. 2019-02-14]. Dostupné z: https://www.alga.cz/UserFiles/mstefanova/files/Mikro%C5%99asy_sol%C3%A1rn%C3%AD%20tov%C3%A1rna%20v%20jedn%C3%A9%20bu%C5%88ce.pdf
- [21] STRŽÍTESKÝ, Luboš a Petr HLAVÍNEK. Mikrořasy jako zdroj surovin. *Tzbinfo* [online]. 2013 [cit. 2019-02-14]. Dostupné z: <https://oze.tzb-info.cz/10141-mikrorasy-jako-zdroj-surovin>
- [22] ANDERSEN, Robert A. *Algal culturing techniques*. Burlington, Mass.: Elsevier/Academic Press, c2005. ISBN 9780120884261.
- [23] CHISTI, Yusuf. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*[online]. 2007, **25**(3), 294-306 [cit. 2019-02-18]. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2007.02.001. ISSN 07349750.
- [24] POSTEN, Clemens. Design principles of photo-bioreactors for cultivation of microalgae. *Engineering in Life Sciences* [online]. 2009, **9**(3), 165-177 [cit. 2019-02-18]. DOI: <https://doi.org/10.1002/elsc.200900003>. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/elsc.200900003>
- [25] BARSANTI, Laura a Paolo GUALTIERI. *Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology*. Boca Raton, Fla.: CRC Press, 2006. ISBN 0-8493-1467-4
- [26] DILLSCHNEIDER, Robert a Clemens POSTEN. Closed Bioreactors as Tools for Microalgae Production. LEE, James W., ed. *Advanced Biofuels and Bioproducts* [online]. New York, NY: Springer New York, 2013, 2013-6-7, s. 629-649 [cit. 2019-02-18]. DOI: 10.1007/978-1-4614-3348-4_26. ISBN 978-1-4614-3347-7. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4614-3348-4_26
- [27] Cultivation of Algae. *Oligae* [online]. [cit. 2019-02-19]. Dostupné z: <http://www.oilgae.com/algae/oil/biod/cult/cult.html>

- [28] COUTTEAU, Peter. Algal production: Physical and chemical conditions. *Food and Agriculture Organization of the United Nation* [online]. [cit. 2019-02-19]. Dostupné z: <http://www.oilgae.com/algae/oil/biod/cult/cult.html>
- [29] BLAIR, Matthew Forrest, Bahareh KOKABIAN a Veera Gnanaswar GUDE. Light and growth medium effect on *Chlorella vulgaris* biomass production. *Journal of Environmental Chemical Engineering* [online]. 2014, 2(1), 665-674 [cit. 2019-02-19]. DOI: 10.1016/j.jece.2013.11.005. ISSN 22133437.
- [30] AMINI KHOEYI, Zahra, Jafar SEYFABADI a Zohreh RAMEZANPOUR. Effect of light intensity and photoperiod on biomass and fatty acid composition of the microalgae, *Chlorella vulgaris*. *Aquaculture International* [online]. 2012, 20(1), 41-49 [cit. 2019-02-19]. DOI: 10.1007/s10499-011-9440-1. ISSN 0967-6120. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10499-011-9440-1>
- [31] JACOB-LOPES, Eduardo, Carlos Henrique Gimenes SCOPARO, Lucy Mara Cacia Ferreira LACERDA a Telma Teixeira FRANCO. Effect of light cycles (night/day) on CO₂ fixation and biomass production by microalgae in photobioreactors. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* [online]. 2009, 48(1), 306-310 [cit. 2019-02-19]. DOI: 10.1016/j.cep.2008.04.007. ISSN 02552701. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0255270108001037>
- [32] MUNIR, N., A. IMITIAZ, N. SHARIF a S. NAZ. Optimization of growth conditions of different algal strains and determination of their lipid content. *The Journal of Animal & Plant Science*. 2015(25), 546-553. ISSN 1018-7081.
- [33] YEH, Kuei-Ling, Jo-Shu CHANG a Wen-ming CHEN. Effect of light supply and carbon source on cell growth and cellular composition of a newly isolated microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31. *Engineering in Life Sciences* [online]. 2010, 10(3), 201-208 [cit. 2019-02-19]. DOI: 10.1002/elsc.200900116. ISSN 16180240. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/elsc.200900116>
- [34] LEE, Choul-Gyun a Bernhard O., PALSSON. High-density algal photobioreactors using light-emitting diodes. *Biotechnology and Bioengineering* [online]. 1994, 44(10), 1161-1167 [cit. 2019-02-19]. DOI: 10.1002/bit.260441002. ISSN 0006-3592. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/bit.260441002>
- [35] CHANG, Hai-Xing, Yun HUANG, Qian FU, Qiang LIAO a Xun ZHU. Kinetic characteristics and modeling of microalgae *Chlorella vulgaris* growth and CO₂ biofixation considering the coupled effects of light intensity and dissolved inorganic carbon. *Bioresource Technology* [online]. 2016, 206, 231-238 [cit. 2019-02-19]. DOI: 10.1016/j.biortech.2016.01.087. ISSN 09608524.
- [36] MAYO, Aloice W. Effects of temperature and pH on the kinetic growth of unialga *Chlorella vulgaris* cultures containing bacteria. *Water Environment Research* [online]. 1997, 69(1), 64-72 [cit. 2019-02-19]. DOI: 10.2175/106143097X125191. ISSN 10614303.
- [37] SIRISANSANEEYAKUL, Sarote, Somruethai SINGHASUWAN, Wanna CHOORIT, Natapas PHOOPAT, Jose Luis GARCIA a Yusuf CHISTI. Photoautotrophic Production of Lipids by Some *Chlorella* Strains. *Marine Biotechnology* [online]. 2011, 13(5), 928-941 [cit. 2019-02-22]. DOI: 10.1007/s10126-010-9355-2. ISSN 1436-2228.

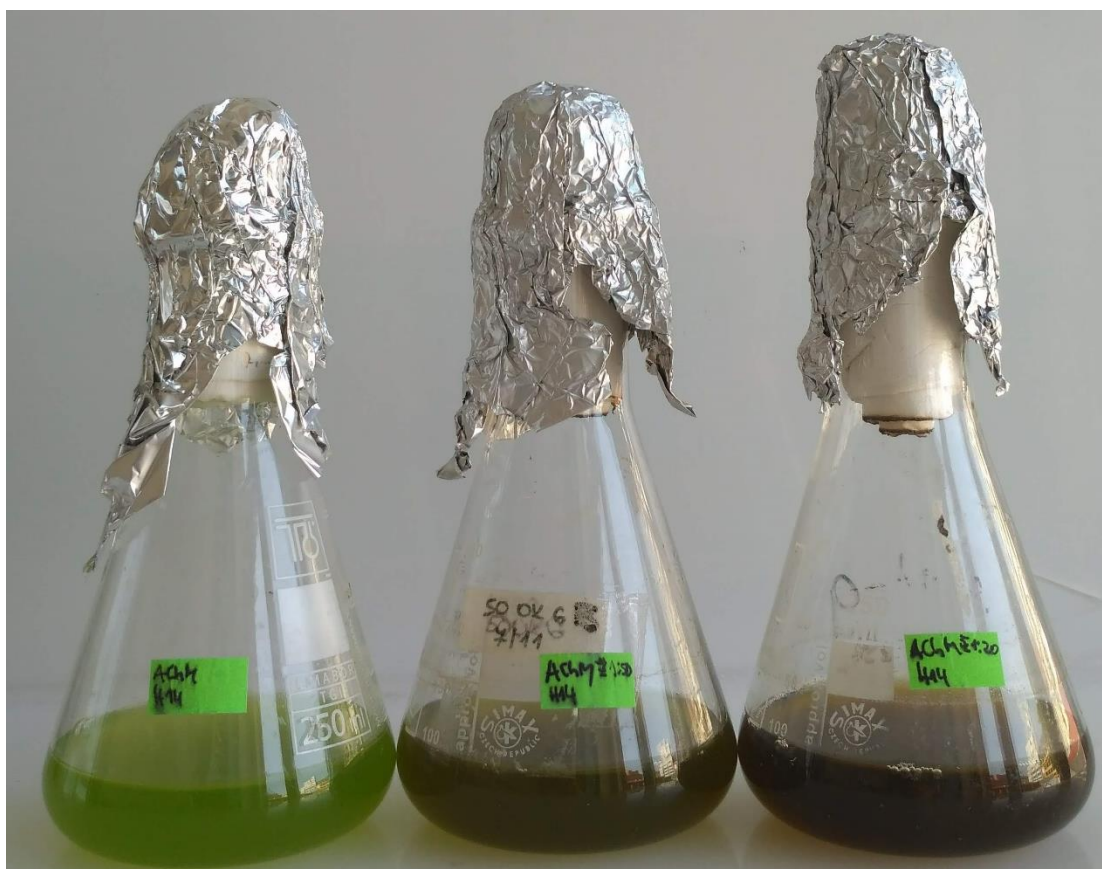
- [38] BECKER, Eberhard W. *Microalgae: biotechnology and microbiology*. New York: Cambridge University Press, 1994. Cambridge studies in biotechnology, 10. ISBN 0-521-06113-X.
- [39] FENG, Yujie, Chao LI a Dawei ZHANG. Lipid production of *Chlorella vulgaris* cultured in artificial wastewater medium. *Bioresource Technology* [online]. 2011, **102**(1), 101-105 [cit. 2019-02-22]. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.06.016. ISSN 09608524.
- [40] CHIU, Sheng-Yi, Chien-Ya KAO, Chiun-Hsun CHEN, Tang-Ching KUAN, Seow-Chin ONG a Chih-Sheng LIN. Reduction of CO₂ by a high-density culture of *Chlorella* sp. in a semicontinuous photobioreactor. *Bioresource Technology* [online]. 2008, **99**(9), 3389-3396 [cit. 2019-02-25]. DOI: 10.1016/j.biortech.2007.08.013. ISSN 09608524.
- [41] LV, Jian-Ming, Li-Hua CHENG, Xin-Hua XU, Lin ZHANG a Huan-Lin CHEN. Enhanced lipid production of *Chlorella vulgaris* by adjustment of cultivation conditions. *Bioresource Technology* [online]. 2010, **101**(17), 6797-6804 [cit. 2019-02-25]. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.03.120. ISSN 09608524.
- [42] GUIRY, M.D. a G.M. GUIRY. *AlgaeBase* [World-wide electronic publication]. National University of Ireland, Galway, 1996 [cit. 2019-08-15]. Dostupné z: <http://www.algaebase.org>
- [43] Vývoj. *FLORIUM* [online]. [cit. 2019-02-26]. Dostupné z: <http://www.florium.cz/eshop/cs/content/7-vyvoj>
- [44] MĚSÍČNÍ DATA. *Český hydrometeorologický ústav* [online]. [cit. 2019-02-26]. Dostupné z: <http://portal.chmi.cz/historicka-data/pocasi/mesicni-data#>
- [45] *ALGATECH* [online]. 2014 [cit. 2019-02-26]. Dostupné z: <https://www.alga.cz/en/>
- [46] MALATEROVA, Ywetta. Frantisek KAŠTÁNEK, Milena ROUSKOVÁ, Martina MATEJKOVÁ, Petr KAŠTÁNEK, a Olga SOLCOVÁ. Microalgae for Bioenergy: Key Technology Nodes, *The Scientific World Journal*, **2015**, Article ID 597618, 6 pages, [cit. 2019-03-11]. DOI: <https://doi.org/10.1155/2015/597618>.
- [47] DA SILVA, Teresa Lopes a Alberto REIS. Scale-up Problems for the Large Scale Production of Algae. DAS, Debabrata, ed. *Algal Biorefinery: An Integrated Approach* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2015, 2015, s. 125-149 [cit. 2019-03-21]. DOI: 10.1007/978-3-319-22813-6_6. ISBN 978-3-319-22812-9. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-22813-6_6
- [48] BOROWITZKA, Michael A. a Avigad VONSHAK. Scaling up microalgal cultures to commercial scale. *European Journal of Phycology*. 2017, **52**(4), 407-418. DOI: 10.1080/09670262.2017.1365177.
- [49] LI, Jian, Daling ZHU, Jianfeng NIU, Songdong SHEN a Guangce WANG. An economic assessment of astaxanthin production by large scale cultivation of *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnology Advances* [online]. 2011, **29**(6), 568-574 [cit. 2019-03-21]. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2011.04.001. ISSN 07349750. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975011000401>
- [50] Photobioreactors. *Bbi biotech: innovation for biotech* [online]. Berlín, Nemecko [cit. 2019-03-21]. Dostupné z: <https://bbi-biotech.com/en/produkte/fermenter-bioreaktoren/photobioreaktoren/>

- [51] WILD, Katharina Judith, Andreas TRAUTMANN, Mirco KATZENMEYER, Herbert STEINGAß, Clemens POSTEN a Markus RODEHUTSCORD. Chemical composition and nutritional characteristics for ruminants of the microalgae *Chlorella vulgaris* obtained using different cultivation conditions. *Algal Research* [online]. 2019, **38** [cit. 2019-03-21]. DOI: 10.1016/j.algal.2018.101385. ISSN 22119264. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211926418306969>

7. PRÍLOHY



Obrázok 21: Optické zmeny pozorované pri závere autotrofnej kultivácie Chlorelly, kmeň 255. Zľava: Chlorellové médium, Ž50 a Ž20



Obrázok 22: Optické zmeny pozorované pri závere autotrofnej kultivácie Chlorelly, kmeň H14. Zľava: Chlorellové médium, Ž 50 a Ž 20



Obrázok 23: Optické zmeny pozorované pri závere hetetrofnej kultivácie Chlorelly, kmeň G11. Zľava: Chlorellové heterotrofné médium, Ž 50 a Ž 20



Obrázok 24: Optické zmeny pozorované pri závere hetetrofnej kultivácie Chlorelly, kmeň C1A. Zľava: Chlorellové heterotrofné médium, Ž 50 a Ž 20



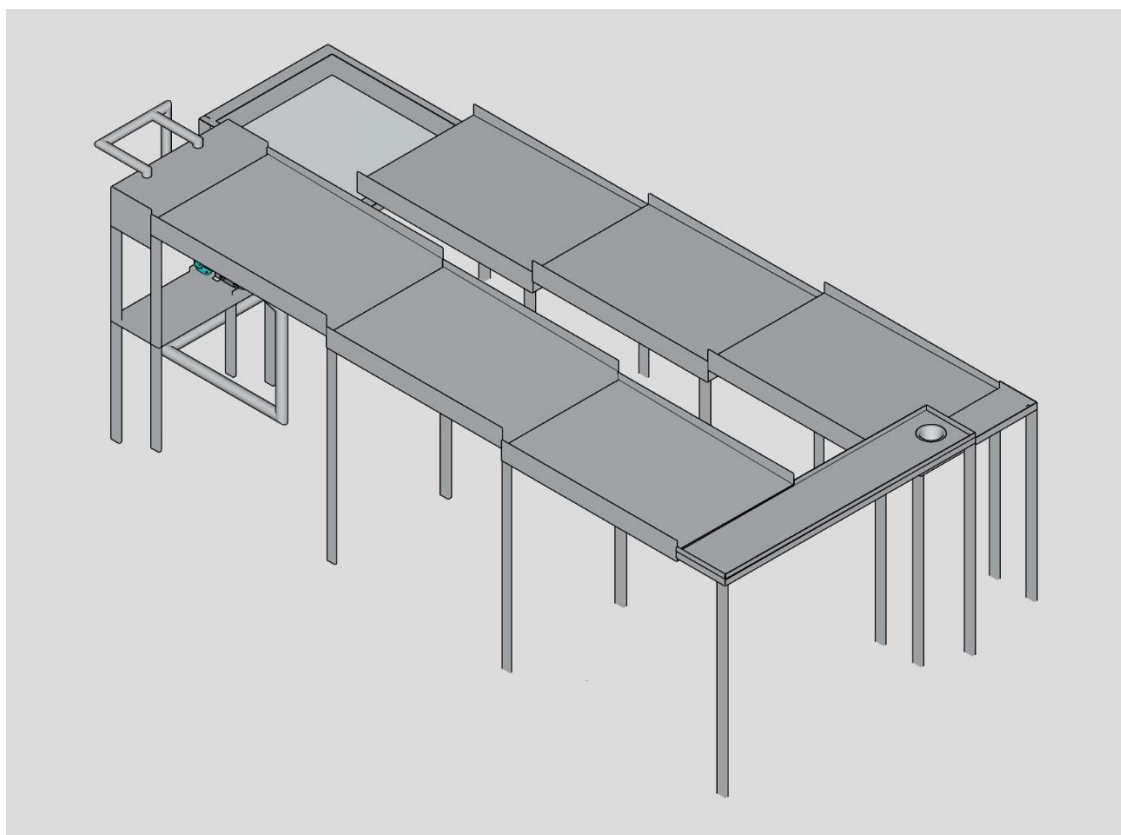
Obrázok 23: Optické zmeny pozorované pri závere hetetrofnej kultivácie Chlorelly, kmeň H14. Zľava: Chlorellové heterotrofné médium, Ž 50 a Ž 20



Obrázok 22: Optické zmeny pozorované pri závere kultivácie na skríženom gradiente, Chlorella, kmeň C1A



Obrázok 24: Optické zmeny pozorované pri závere kultivácie na skríženom gradiente, *Coccomyxa*



Obrázok 25: 3D model kaskádovej plošiny vyrobený v programe SkatchUp



Obrázok 26: Model kaskádovej plošiny zhora, vyrobený v programe SkatchUp



Obrázok 27: Skrížené gradienty